

FOLHA DE ROSTO QUE NÃO É PARA IMPRIMIR, MAS SIM PARA QUE O WORD POSSA CONTABILIZAR.

Rasgar ESTA FOLHA E COLOCAR A OUTRA QUE ESTÁ NO FICHEIRO

“FOLHA DE ROSTO. NÃO ESTÁ NUMERADA E BEM, MAS CONTA.

Agradecimentos

A todos os meus amigos e família que tornaram possível a escrita desta monografia, o meu profundo e mais sincero obrigado.

Uma especial palavra de apreço e agradecimento ao meu orientador Professor Doutor Franklim Marques, por todo o apoio e conhecimento transmitido.

Resumo

Ao longo dos últimos anos, a investigação no domínio das terapias celulares através do uso de células estaminais tem demonstrado resultados promissores. De facto, sob o ponto de vista de aplicação, o potencial destas células tem demonstrado melhorias substanciais no campo das terapias genéticas e regenerativas, bem como na compreensão e identificação de potenciais alvos terapêuticos.

Na presente monografia, uma abordagem sob os diferentes tipos de células estaminais desde embrionárias às adultas serão evidenciados, com particular ênfase sobre as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs). As iPSCs são células somáticas que resultam de uma reprogramação genética, da qual advém a obtenção de um estado de pluripotência. Tal como as células estaminais embrionárias (ESCs), as iPSCs evidenciam igualmente uma mesma morfologia e expressão de marcadores de pluripotência, bem como a capacidade de se diferenciarem em todo o tipo de tecidos.

Assim, sob o ponto de vista científico, estudos têm demonstrado o seu enorme potencial não só no âmbito de estudos funcionais bem como, sob ponto de vista de aplicação em vários domínios de doença, como por exemplo nas doenças cardiovasculares e doenças do sistema nervoso.

Palavras-chave: células estaminais; células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs); células estaminais embrionárias (ESCs); pluripotência.

Abstract

In the last years, the investigation in cell therapies field through the usage of stem cells has seen a huge progress. In fact, under an application point of view, the potential of this cells has shown substantial improvements in genetic and regenerative therapies, as well as in understanding and identifying potential therapeutic targets.

In this work, an approach on the different types of stem cells since embryonic to adults is done, with special emphases in induced pluripotent stem cells (iPSCs).

iPSCs are somatic cells that are the outcome of a genetic reprogramming, from which results in achieving a pluripotent state.

As embryonic stem cells (ESCs), iPSCs also show a similar morphology and pluripotent expression markers, as well as the ability to differentiate themselves in all kinds of tissue types.

Under a scientific point of view, studies have shown their huge potential not only in functional studies, but also, under the point of view of application in various disease domains, as for example cardiac disease and nervous system disease.

Keywords: stem cells; induced pluripotent stem cells (iPSCs); embryonic stem cells (ESCs); pluripotency.

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 CÉLULAS ESTAMINAIS	14
1.2 CONCEITO DE TOTIPOTÊNCIA, PLURIPOTÊNCIA E MULTIPOTÊNCIA	17
1.3 PROPRIEDADES QUE TORNAM ÚNICAS AS CÉLULAS ESTAMINAIS	18
2. CÉLULAS ESTAMINAIS EMBRIONÁRIAS (ESCs)	19
2.1 CRESCIMENTO DAS ESCs EM LABORATÓRIO	25
2.2 IDENTIFICAÇÃO DE ESCs EM LABORATÓRIO	26
2.3 DIFERENCIAÇÃO DAS ESCs	27
2.4 USO DE ESCs DE RATINHO NA CIÊNCIA E NA MEDICINA	28
3. CÉLULAS ESTAMINAIS ADULTAS	29
3.1 LOCAIS E FUNÇÕES DAS CÉLULAS ESTAMINAIS ADULTAS	32
3.2 TESTES USADOS NA IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS ADULTAS	33
3.3 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS ADULTAS	34
3.4 CÉLULAS ESTAMINAIS HEMATOPOIÉTICAS	35
3.5 CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMAIS	36
3.6 CÉLULAS ESTAMINAIS NEURAIS	37
3.7 CÉLULAS ESTAMINAIS FETAIS DO CORDÃO UMBILICAL	38
3.8 CÉLULAS ESTAMINAIS DE CANCRO	40
4. CÉLULAS ESTAMINAIS EMBRIONÁRIAS VERSUS CÉLULAS ESTAMINAIS ADULTAS	42
5. REPROGRAMAÇÃO NUCLEAR	47
6. CÉLULAS ESTAMINAIS PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSCS)	50
6.1 O ESTUDO – ORIGEM DAS iPSCs	53
6.1.1 <i>Notas finais do estudo – origem das iPSCs</i>	61
6.1.2 <i>Avanços</i>	63
6.2 A GRANDE QUESTÃO: SÃO AS iPSCs DIFERENTES DAS ESCs?	65
6.3 APLICAÇÃO DAS iPSCs	67
6.3.1 <i>Modelos de Doença</i>	67
6.3.2 <i>Screening de fármacos Medicamentos</i>	72
6.3.3 <i>Terapia Celular</i>	74
6.3.4 <i>Alguns Trabalhos Desenvolvidos com iPSC</i>	76
7. AS CÉLULAS IPSCS RESOLVEM OS PROBLEMAS ÉTICOS ACERCA DA INVESTIGAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS EMBRIONÁRIAS?	80
7.1 INFORMAR OS DOENTES	82
8. IMPORTÂNCIA DAS IPSCS: PERSPECTIVAS FUTURAS	85
9. CONCLUSÃO	88

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
11. ANEXO: RELATÓRIO DE ESTÁGIO	102
11.1 AGRADECIMENTOS	103
11.2 RESUMO	104
11.3 ABSTRACT	105
11.4 INTRODUÇÃO	106
11.5 FASE PRÉ-ANALÍTICA	107
11.5.1 <i>Sistemas de colheita</i>	109
11.5.2 <i>Procedimento de colheita de sangue venoso</i>	110
11.5.3 <i>Procedimento de colheita de hemoculturas</i>	113
11.5.4 <i>Triagem e rejeição de amostras</i>	115
11.5.5 <i>Separação de amostras</i>	116
11.5.6 <i>Distribuição pelos sectores e elaboração de listas de trabalho</i>	117
11.5.7 <i>Anticoagulantes</i>	118
11.6 FASE ANALÍTICA	119
11.6.1 <i>Sector de bioquímica clínica</i>	120
11.6.2 <i>Sector de Hematologia</i>	137
11.6.3 <i>Sector da Coagulação/Hemostase</i>	141
11.6.4 <i>Sector de Imunologia e Serologia</i>	144
11.6.5 <i>Sector da Microbiologia</i>	149
11.6.6 <i>Controlo de Qualidade</i>	154
11.7 FASE PÓS-ANALÍTICA	155
11.8 CONCLUSÃO	156
11.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

Índice de Figuras

Figura 1 - Diferenciação de uma célula estaminal (do inglês stem cell).....	14
Figura 2 - Propriedades das células estaminais.	15
Figura 3 - Nichos das células estaminais adultas.	16
Figura 4 - Conceitos de "totipotência", "pluripotência" e "multipotência".	17
Figura 5 - Desenvolvimento do blastocisto - massa celular interna (do inglês, <i>inner cell mass</i>).....	21
Figura 6 - Características das células estaminais embrionárias.....	22
Figura 7 - Esquema do desenvolvimento precoce do ratinho que descreve a relação entre as populações das células estaminais para os folhetos germinativos.....	24
Figura 8 - Cultura de células estaminais embrionárias - corpos embrionários (do inglês <i>embryoid bodies</i>).	27
Figura 9 - Diferenciação de uma célula estaminal adulta - célula estaminal neural.....	30
Figura 10 – Exemplos de vias de diferenciação de células estaminais adultas que foram demonstradas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	34
Figura 11 - Fontes de células estaminais embrionárias e células estaminais adultas. ...	44
Figura 12 - Reprogramação celular - clones de rãs.....	48
Figura 13 - Reprogramação de células somáticas - iPSCs.	51
Figura 14 - Estratégia para testar factores de transcrição candidatos a induzir pluripotência.....	54
Figura 15 - Morfologia de células estaminais embrionárias, iPSCs (iPS-MEF24) e MEFs.....	55
Figura 16 - Análise PCR para marcadores de genes de células estaminais embrionárias em iPS (iPS-MEF 24), células estaminais embrionárias e MEFs. <i>Nat1</i> foi usado como controlo.	56
Figura 17 - Efeito da remoção individual de factores, dos 10 factores seleccionados na formação de colónias resistentes a G418.....	57
Figura 18 - Análise RT-PCR de marcadores genéticos de células estaminais embrionárias em células iPS, células estaminais embrionárias e MEFs.	58
Figura 19 - Vários tecidos presentes em teratomas derivados de células iPS-MEF4.....	59

Figura 20 – Imunofluorescência. Confirmação <i>in vitro</i> da diferenciação nas 3 camadas germinativas (<i>smooth muscle actin</i> - marcador para mesoderme; <i>α-fetoprotein</i> - marcador para a endoderme; <i>βIII-tubulin</i> - marcador para a ectoderme).	59
Figura 21 - Esquema representativo de reprogramação e diferenciação de iPSCs (1- células somáticas são obtidas a partir de organismos adultos; 2 – factores de transcrição são introduzidos <i>in vitro</i> ; 3 e 4 – obtêm-se populações de células pluripotentes que podem ser diferenciadas em diferentes linhagens celulares.	64
Figura 22 - Modelo integrado para descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos baseado na tecnologia das iPSCs.	73
Figura 23 - Diversas aplicações das iPSCs.	75
Figura 24 - Modelação de doenças neurológicas utilizando a tecnologia das iPSCs.	77
Figura 25 - Estratégias para reparação do músculo cardíaco recorrendo a células estaminais adultas.	78

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Características das células estaminais embrionárias e das células estaminais adultas.....	46
Tabela 2 - Características das Células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs).	62
Tabela 3 - Compilação de 22 modelos de doença publicados recorrendo à tecnologia das iPSCs.	69
Tabela 3 – continuação da tabela anterior - Compilação de 22 modelos de doença publicados recorrendo à tecnologia das iPSCs.	70
Tabela 4 – Número de hemoculturas a colher de acordo com a patologia em vigor no laboratório do HFZ.	114
Tabela 5 – Tubos de colheita e respectivos anticoagulantes existentes do laboratório do HFZ.	118

Lista de Abreviaturas

- ESCs** – células estaminais embrionárias
- iPSCs** – células estaminais pluripotentes induzidas
- EpiSC** – células estaminais do epiblasto
- hESCs** – células estaminais embrionárias humanas
- BMP4** – proteína óssea morfogenética 4
- LIF** – factor inibidor de leucemia
- SCNT** – transferência do núcleo somático (do inglês, *somatic cell nuclear transfer*)
- MEFs** – fibroblastos embrionários de ratinho
- iPS-MEFs24** – células estaminais pluripotentes induzidas por fibroblastos embrionários de ratinho de 24 factores
- PCR** – reacção em cadeia da polimerase
- iPS-MEFs4** - células estaminais pluripotentes induzidas por fibroblastos embrionários de ratinho de 4 factores
- RT-PCR** - reacção de transcriptase reversa, seguida da reacção da polimerase em cadeia (do inglês, *reverse transcription pplymerase chain reaction*)
- hiPSCs** – células estaminais pluripotentes induzidas humanas
- ADN** – ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
- PINK1** – gene PINK 1
- LLK2** – gene LLK2
- ISSCR** – Internacional Society for Stem Cells Research
- FDA** – Food and Drug Administration
- EMA** – Agência Europeia do Medicamento
- HLA** – sistema antigénio leucocitário (do inglês, *human leukocyte antigen*)
-
- HFZ** – Hospital Dr. Francisco Zagalo
- PCR** – Proteína C reactiva
- PTOG** – Prova de Tolerância Oral à Glicose
- LDL** – Lipoproteínas de baixa densidade (do Inglês, *Low Density Lipoprotein*)
- HDL** – Lipoproteínas de alta densidade (do Inglês, *High Density Lipoprotein*)

AST – Aspartato aminotransferase

ALT – Alanina aminotransferase

TP – Tempo de Protrombina

APTT – Tempo de Tromboplastina Parcial Activada

INR – Razão Normalizada Internacional

CID – Coagulação Intravascular Disseminada

1. Introdução

1.1 Células Estaminais

As células estaminais são células que detêm o potencial de se desenvolverem e diferenciarem em vários tipos de células do organismo. Estas células estão presentes em nichos, nomeadamente na medula óssea, cérebro, fígado, pele, entre outros, e actuam como uma espécie de mecanismo de reparação, dividindo-se indefinidamente e substituindo células mortas ou danificadas, assegurando, assim, a manutenção dos tecidos e órgãos durante toda a vida^{1,2}.

Quando uma célula estaminal se divide, cada nova célula goza do potencial de permanecer uma célula estaminal ou diferenciar-se numa célula especializada como, por exemplo, uma célula cerebral ou uma célula sanguínea³.

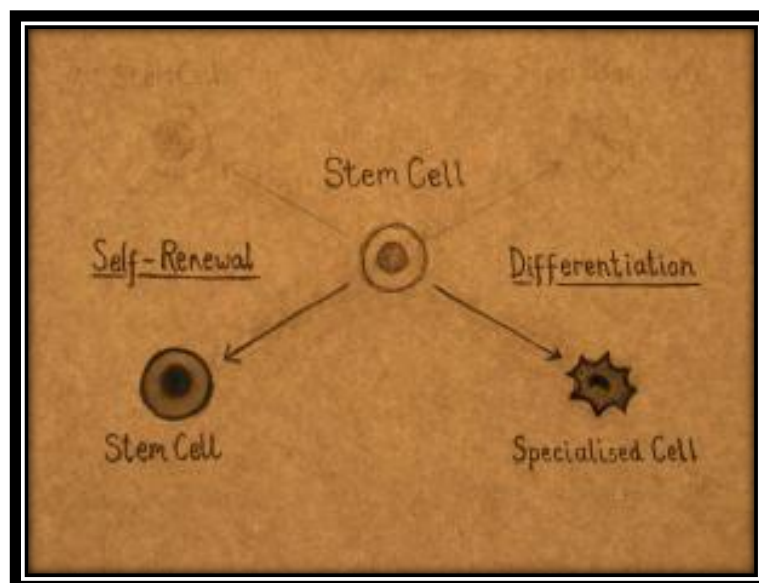


Figura 1 - Diferenciação de uma célula estaminal (do inglês stem cell).

Fonte: http://www.isscr.org/docs/default-source/isscr-publications/isscr_11_stemcellfactbrch_fnl4

As células estaminais distinguem-se então das demais células, devido a duas importantes características, capacidade de auto-renovação e capacidade de diferenciação. Ou seja, são células não especializadas capazes de se renovarem a elas próprias através da divisão celular, mesmo após longos períodos de inatividade, sob determinadas condições fisiológicas ou experimentais, e podem ser induzidas a originar um tecido ou órgão com funções específicas³.

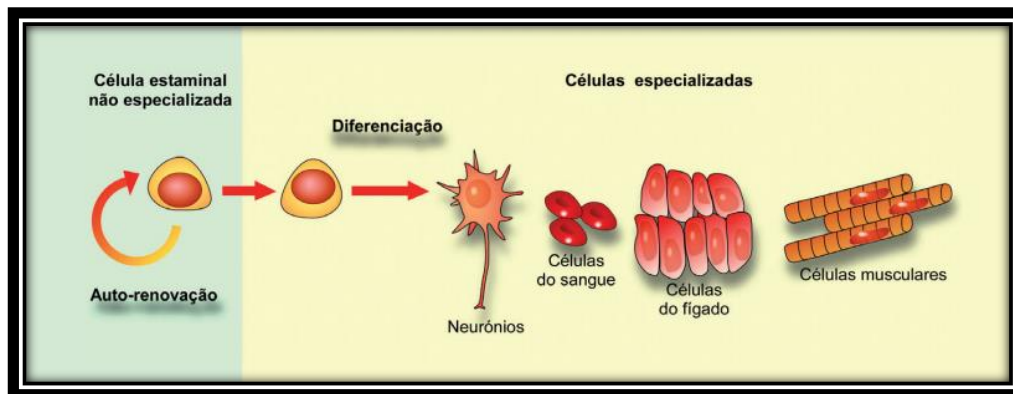


Figura 2 - Propriedades das células estaminais.

Fonte: Adaptado de Nirmalanandhan & Sittampalam, 2009²

É importante referir que em determinados órgãos, como a medula óssea e o intestino, as células estaminais dividem-se regularmente para reparar e substituir tecido danificado, enquanto noutros órgãos como no pâncreas e no coração, só se dividem sob determinadas condições especiais.

Devido às suas capacidades regenerativas únicas, as células estaminais aparecem como um potencial no tratamento de várias doenças, como diabetes, doenças neurológicas e doenças cardiovasculares. Também, as células estaminais têm sido utilizadas em laboratório para o *screening* de novos medicamentos e no desenvolvimento de modelos de doença².

Até agora, os cientistas têm trabalho principalmente com dois tipos de células estaminais de animais e humanas: **células estaminais embrionárias (ESCs)** e **células estaminais não embrionárias adultas** ou também conhecidas como **células somáticas**.

Há mais de 30 anos que foi descoberta a obtenção de ESCs de embriões de ratinho, e o estudo detalhado destas permitiu levar à descoberta, em 1998, de um método de obtenção de células estaminais de embriões humanos e seu crescimento em laboratório. Estas células são apelidadas de células estaminais embrionárias humanas. Os embriões utilizados nestes estudos foram obtidos de embriões utilizados para fins reprodutivos (fertilização *in vitro*) que, quando já não necessários, foram doados para investigação com o consentimento do dador³.

Em 2006, um novo avanço foi conseguido com a identificação de condições que permitem a algumas células adultas especializadas serem reprogramadas geneticamente e voltarem a assumir características de células estaminais.

A estas células chamamos de **células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs)** e que serão o foco desta monografia.

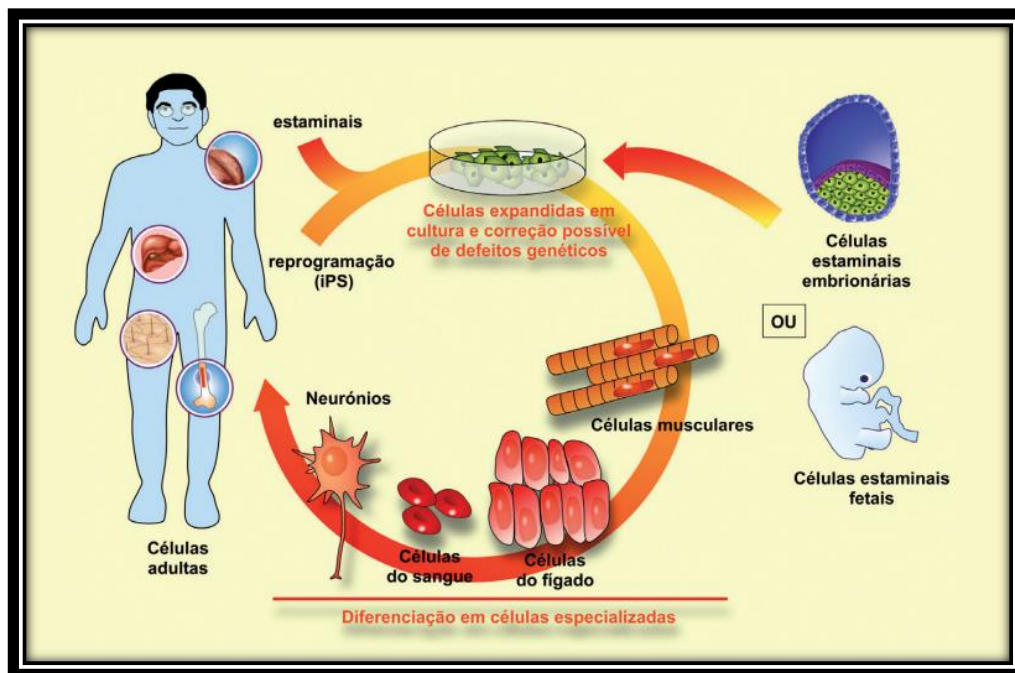


Figura 3 - Nichos das células estaminais adultas.

Fonte: Adaptado de Lerou & Daley, 2005³

1.2 Conceito de Totipotência, Pluripotência e Multipotência

Para a melhor compreensão desta monografia, torna-se necessário definir os conceitos de **“totipotência”**, **“pluripotência”** e **“multipotência”**.

Entende-se por totipotência, a propriedade de células que possuem a capacidade de dar origem a todas as células diferenciadas do organismo adulto, incluindo a parte fetal da placenta, o cordão umbilical e as membranas extra-embrionárias^{1,2}.

O óócito fertilizado e as células que imediatamente surgem nas primeiras divisões, são as únicas células totipotentes. Isso significa que, sob determinadas condições, estas células totipotentes possuem a capacidade de dar origem a um embrião viável.

Por pluripotência, entende-se a propriedade de células se diferenciarem em todos os tecidos do organismo adulto, excluindo placenta e anexos embrionários.

É importante referir que nenhum estudo de linhas celulares de células estaminais embrionárias é capaz de, por si só, originar um embrião viável. Isto porque, são células pluripotentes e não totipotentes^{1,2}.

A propriedade das células poderem dar origem a um número limitado de tipos de células, define-se como multipotência⁴.

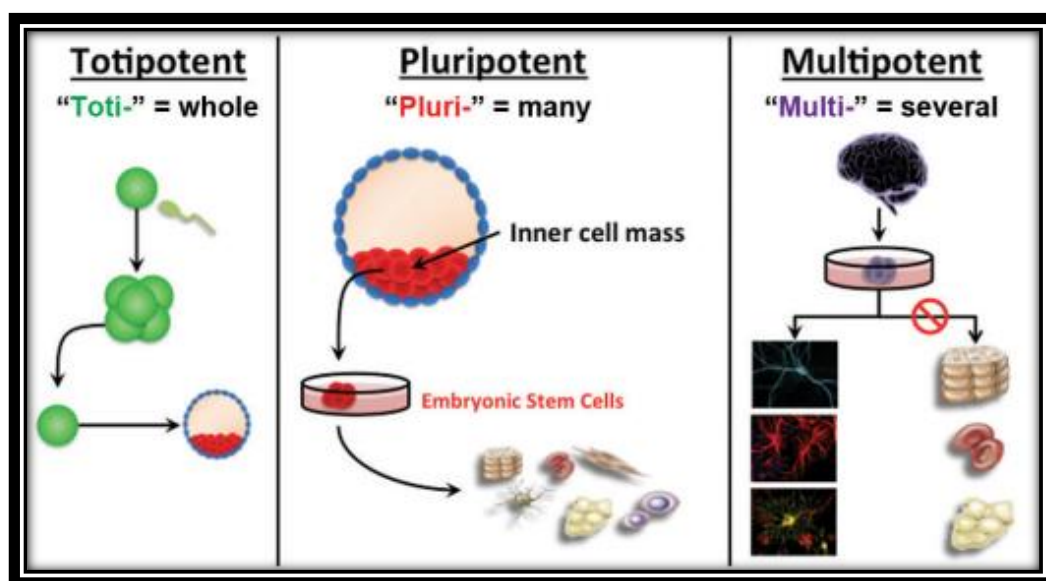


Figura 4 - Conceitos de "totipotência", "pluripotência" e "multipotência".

Fonte: http://www.isscr.org/docs/default-source/isscr-publications/isscr_11_stemcellfactbrch_fnl4

1.3 Propriedades que tornam únicas as Células Estaminais

As células estaminais diferem, como já foi referido, das outras células do nosso organismo. Todas as células estaminais, independentemente da sua fonte, possuem três propriedades gerais, são capazes de se dividir e renovar por longos períodos, não são especializadas e podem-se diferenciar em células especializadas³.

Ao contrário das células especializadas como as células musculares, células sanguíneas ou as células nervosas, que normalmente não se replicam, as células estaminais podem replicar-se múltiplas vezes ou proliferar possuindo, então, a capacidade de se dividir e renovar por longos períodos de tempo.

Para os cientistas é fundamental tentar compreender estas propriedades fundamentais das células estaminais e que estão relacionadas com a sua auto-renovação ao longo do tempo, já que tal permite que as ESCs proliferem um ano, ou mais, em laboratório sem diferenciação, ao contrário das células estaminais adultas. Torna-se fundamental compreender, quais os factores específicos, em organismos vivos, que normalmente regulam a proliferação e a auto-renovação¹.

A clarificação destas questões poderá tornar possível compreender como a proliferação celular é regulada durante o desenvolvimento embrionário normal ou durante a divisão celular anormal que conduz à formação de cancro. Com este esclarecimento, poderá ser possível a geração, em laboratório, de células estaminais de forma mais eficaz.

Para além disso, o avanço na compreensão dos mecanismos de sinalização intra e extra-celulares que permitem a diferenciação das células estaminais em células especializadas, reveste-se de grande importância para que se possa levar a cabo a diferenciação de células estaminais em laboratório e, consequentemente, ao crescimento de células e tecidos, que podem ser usados na terapia celular, assim como no *screening* de novos medicamentos².

2. Células Estaminais Embrionárias (ESCs)

Durante a embriogénese, assiste-se a uma diminuição gradual do potencial de diferenciação das células que constituem o embrião.

O ócito é fecundado pelo espermatozóide, formando-se uma célula cujo núcleo contém 23 pares de cromossomas (23 cromossomas de origem materna e 23 cromossomas de origem paterna). Esta célula é sujeita a repetidas divisões celulares, dando origem ao embrião que irá implantar-se no útero e desenvolver-se até formar o feto.

Como já foi referido, o ócito fecundado é a única célula totipotente e, após alguns ciclos de divisão celular, forma-se o blastocisto, composto por uma parede de células externas – trofoblasto, que forma uma cavidade – blastocélio – e que encerra, num dos pólos, um agregado de células denominado de massa celular interna (do inglês, *inner mass cell*). Nesta fase, as células iniciam a sua especialização e começam a perder o seu potencial de diferenciação em todas as linhagens do organismo adulto⁵.

As células do trofoblasto dão origem aos tecidos extra-embrionários, tal como a placenta, o córion e o saco amniótico, e as células da massa celular interna dão origem ao epiblasto, precursor do embrião propriamente dito e que é a origem das três camadas germinativas do embrião – ectoderme, mesoderme e endoderme, das quais derivarão todos os tecidos e órgãos⁵.

As células da massa celular interna são pluripotentes e, após implantação no útero, dão origem às ESCs.

Assim, as células estaminais embrionárias têm origem embrionária e podem ser obtidas a partir da massa celular interna de blastócitos pré-implantados⁵.

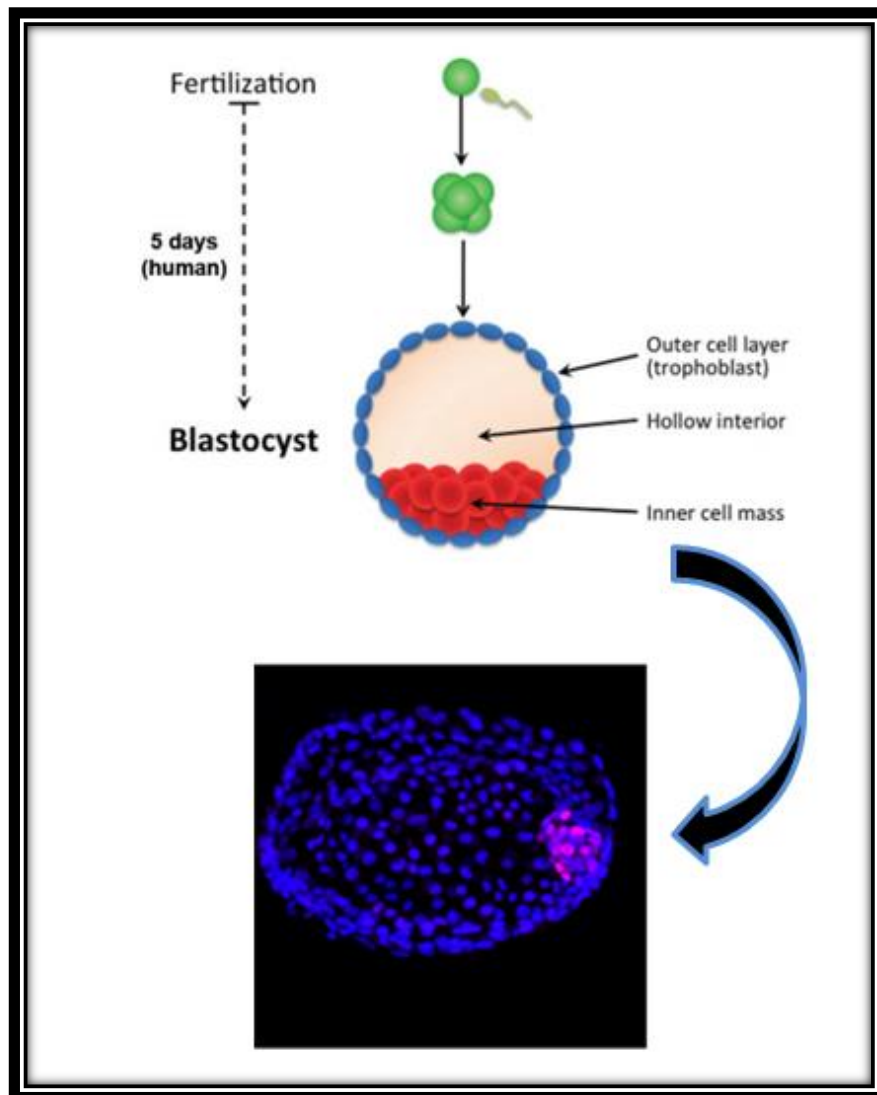


Figura 5 - Desenvolvimento do blastocisto - massa celular interna (do inglês, *inner cell mass*).

Fonte: Adaptado de Smith, 2010⁵

As ESCs possuem um potencial de diferenciação quase ilimitado, podendo dar origem a quase todos os tipos celulares incluindo as células germinativas, salvo algumas exceções, nomeadamente à placenta sendo, por isso, as únicas células verdadeiramente pluripotentes⁵.

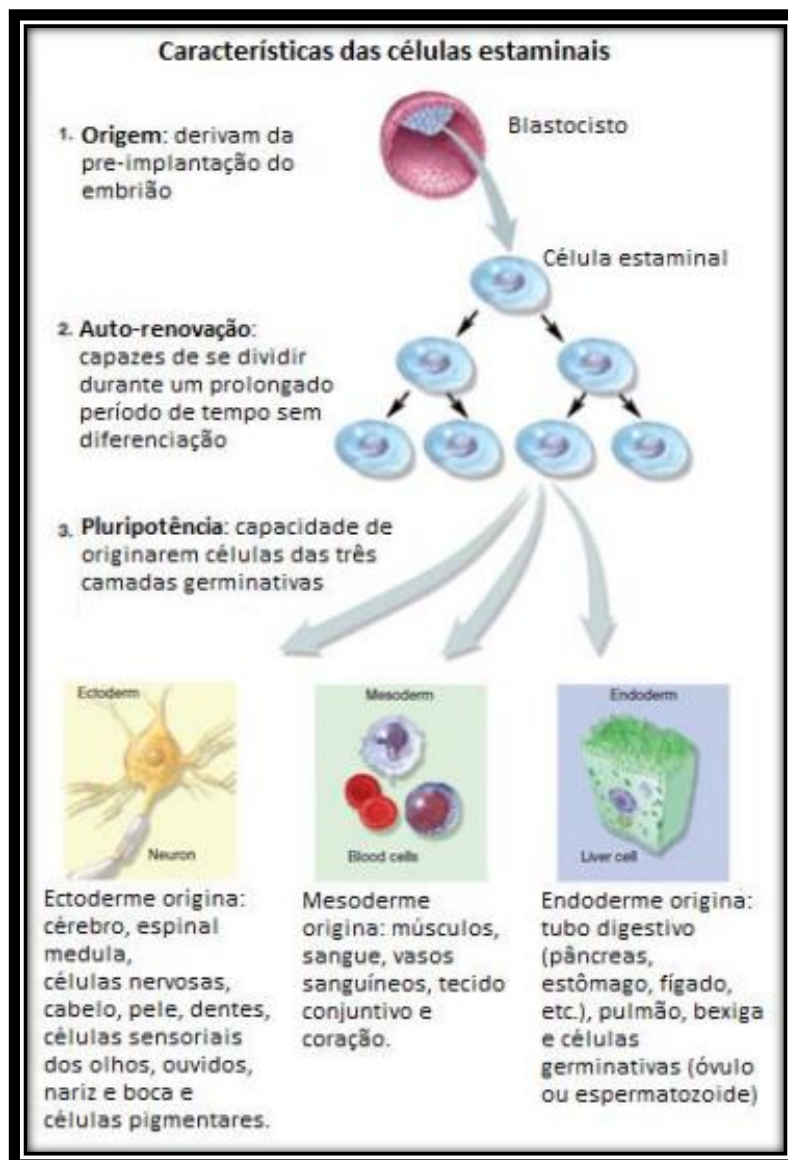


Figura 6 - Características das células estaminais embrionárias.

Fonte: Adaptado de Nirmalanandhan & Sittampalam, 2009²

Logo a seguir à implantação do blastocisto no útero, podem derivar-se células estaminais pluripotentes a partir do epiblasto – células estaminais do epiblasto (do inglês, *Epiblast stem cells* ou EpiSC)⁶.

Por razões éticas óbvias, a manipulação de embriões humanos é controversa, pelo que os estudos com ESCs são levadas a cabo normalmente através de embriões de mamíferos, nomeadamente de ratinhos.

Como foi referido anteriormente, as células estaminais embrionárias humanas (hESCs) são obtidas através de embriões resultantes de fertilização *in vitro* para a reprodução medicamente assistida e que são doados, com consentimento do dador, para a investigação, quando já não são necessárias para esse fim.

Em 1981, foram descritas as primeiras ESCs *in vitro* isoladas a partir de blastocisto de ratinho. Martin Evans, Matt Kaufman e Gail Martin, descobriram que essas células expostas a meios apropriados de cultura podiam parar o seu desenvolvimento e diferenciação e continuar o processo de divisão mantendo assim, sua pluripotência. Ao mesmo tempo, também mantinham a capacidade de diferenciação para fenótipos maduros de células somáticas, quando expostas a sinais apropriados⁵.

A proteína óssea morfogenética 4 (BMP4), na presença de factor inibidor de leucemia (LIF), permite o crescimento das células ESCs indiferenciadas *in vitro*¹.

As hESCs diferem das de ratinho neste ponto, já que, quando induzidas com BMP4, dão origem a células que exibem características da linhagem trofoblasto^{3,7,8}.

Quando são removidos esses factores, as ESCs iniciam o seu processo de diferenciação e, sob determinadas condições, dão origem aos três folhetos embrionários. Estes, por sua vez, irão dar origem aos órgãos e tecidos dos organismos vivos.

Em resumo, as células estaminais embrionárias são então células capazes de formar todos os tipos de células que constituem um organismo adulto, menos placenta e tecidos extra-embrionários. Ou seja, estas células pluripotentes não podem dar origem a um indivíduo de maneira independente⁸.

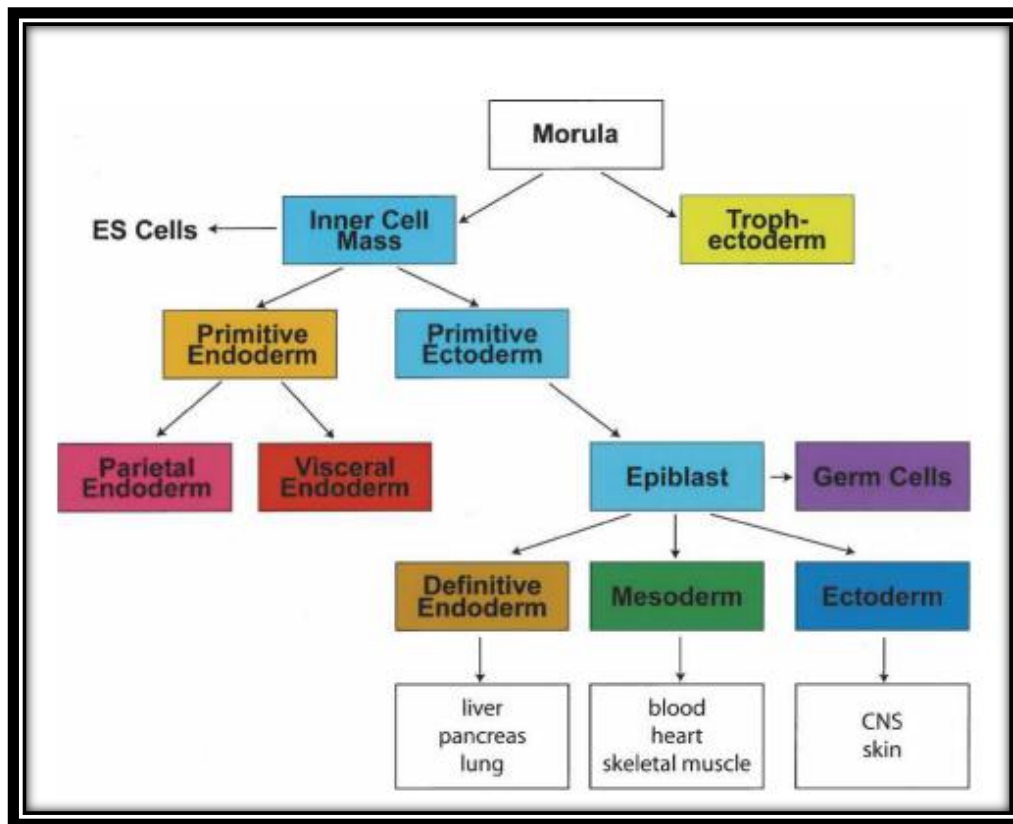


Figura 7 - Esquema do desenvolvimento precoce do ratinho que descreve a relação entre as populações das células estaminais para os folhetos germinativos.

Fonte: Keller, 2005⁷

As células estaminais embrionárias de ratinho têm sido fundamentais para a compreensão dos processos de desenvolvimento embrionário, assim como no estabelecimento das bases moleculares da pluripotência e da auto-renovação. Também, possuem um papel crucial no estudo da função genética *in vivo*, por permitirem a criação de animais *knock-outs* (animais transgénicos) através da recombinação homóloga⁷.

Por último, é importante referir que as células estaminais humanas poderão ser usadas no tratamento de doenças como doença de Parkinson, diabetes entre outras. No entanto, é importante recordar as dificuldades éticas já referidas, assim como o problema da rejeição após o transplante nos doentes. Uma forma de contornar estes dois problemas, poderá ser através da geração de células pluripotentes directamente das células dos próprios pacientes, como será abordado mais à frente nesta monografia.

2.1 Crescimento das ESCs em Laboratório

O processo de crescimento de células em laboratório é apelidado de cultura celular. As células estaminais embrionárias humanas são geradas em laboratório através da transferência de células do embrião para uma placa de cultura que contém meio de crescimento.

No protocolo original, as células dividem-se e espalham-se sobre a superfície da placa, ficando a superfície interior do prato de cultura revestida com células embrionárias de pele de ratinho especialmente tratadas de forma a que estas não se dividam.

Esta camada de revestimento de células é chamada, membrana de nutrição (do inglês, *feeder layer*)⁸.

As células de ratinho no fundo do prato de cultura garantem às células uma superfície pegajosa à qual elas se aderem. Adicionalmente, a membrana de nutrição liberta nutrientes para o meio de cultura. Os investigadores têm actualmente outras fórmulas de gerar células estaminais embrionárias sem recorrerem a células de ratinho como suplemento.

Este é um avanço científico importante devido aos vírus e outras moléculas presentes nas células de ratinho que podem ser transmitidos às células humanas.

O processo de geração de uma linha de ESCs é de certa forma ineficiente, de tal forma que as linhas não são produzidas de cada vez que as células provindas do embrião na fase de pré-implementação são colocadas num prato de cultura. Quando a linha celular é estabelecida, as células originais dão origem a milhões de células estaminais embrionárias⁸.

As células embrionárias que proliferam numa cultura celular por um longo período de tempo sem se diferenciarem e são pluripotentes, são chamadas de cultura celular de células estaminais embrionárias. Em qualquer estadio do processo, as células podem ser congeladas para posteriores culturas e protocolos experimentais.

2.2 Identificação de ESCs em Laboratório

Na geração de linhas celulares de células estaminais embrionárias, são utilizados métodos que permitem aferir se essas células exibem as propriedades fundamentais das células ES. Assim, através do crescimento e subculturas de células estaminais por vários meses, permite assegurar a capacidade de crescimento das células por longos períodos, assim como a capacidade de se auto-renovarem. Adicionalmente, através da observação microscópica, é possível verificar se as células estão saudáveis e permanecem num estado indiferenciado⁸.

A presença de determinados factores de transcrição tipicamente produzidos por células não diferenciadas, como o Nanog e o Oct3/4, é outra forma de aferição dessas características. Os factores de transcrição são fundamentais no “ligar” e “desligar” genes no tempo certo, o que se traduz importante no processo de diferenciação e desenvolvimento embrionário.

Outro ponto importante é a observação dos cromossomas através de microscopia, já que permite verificar se estes estão danificados, se há alteração no número dos mesmos e, portanto, se existem ou não mutações genéticas.

Para verificar se as células estaminais embrionárias humanas são pluripotentes deve-se:

- permitir que as células se diferenciem de forma espontânea em cultura celular;
- manipular as células de forma a se diferenciarem em células características das três linhas celulares;
- ou injectar as células em ratinhos imunossuprimidos e verificar a formação de tumor benigno – teratoma. Com a supressão do sistema imunitário do ratinho, as células estaminais humanas não são rejeitadas, permitindo a observação do crescimento e da diferenciação das células estaminais humanas⁸.

Os teratomas tipicamente contêm uma mistura de células diferenciadas e parcialmente diferenciadas em diferentes células, o que indica que as células ES são capazes de se diferenciarem em diferentes tipos de células⁸.

2.3 Diferenciação das ESCs

Sob as condições apropriadas, as células estaminais embrionárias podem permanecer indiferenciadas em cultura. No entanto, caso se permita que as células se agrupem e formem corpos embrionários (do inglês, *Embryoid bodies*), estas iniciam a sua diferenciação de forma espontânea, em células especializadas como por exemplo células nervosas ou musculares⁸.

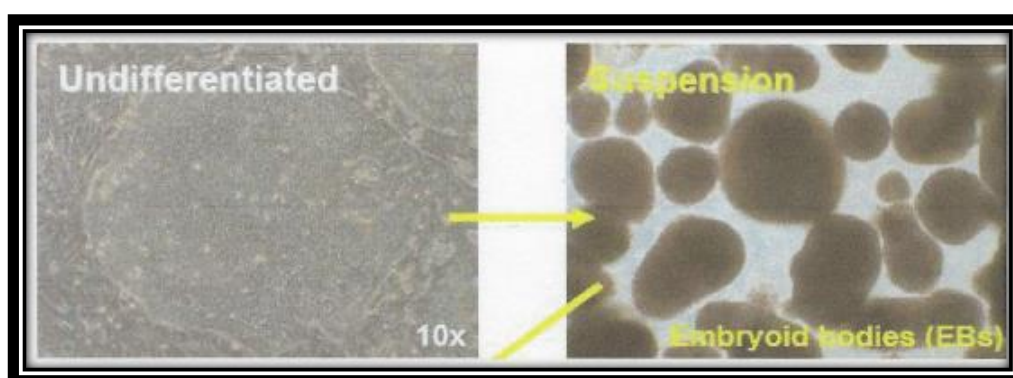


Figura 8 - Cultura de células estaminais embrionárias - corpos embrionários (do inglês *embryoid bodies*).

Fonte: Nagy & Vintersen, 2006⁸

Através do controlo da composição do meio de cultura, da alteração da superfície do prato de cultura, ou com a introdução de genes específicos, consegue-se a que as células estaminais embrionárias se diferenciem em células específicas.

2.4 Uso de ESCs de Ratinho na Ciência e na Medicina

As ESCs de rato podem ser introduzidas num blastocisto de ratinho e este, por sua vez, pode ser implantando no útero de uma fêmea e continuar o seu desenvolvimento em feto.

Após injectadas, estas células passam assim a fazer parte do desenvolvimento fetal, dando origem a um ratinho com mistura de células, ou seja, células da fêmea onde foi implantado o blastocisto e ESCs que foram injectadas. A este ratinho com duas origens diferentes dá-se o nome de quimera. As quimeras transmitem os seus genes à sua descendência e, portanto, os genes das ESCs injectadas⁸.

Assim, é possível em laboratório proceder à alteração de genes de ESCs e introduzi-las em blastocistos que darão origem a ratinhos geneticamente modificados. Tal é importante para o estudo genético de inúmeras doenças em humanos.

Por exemplo, a criação de ratinhos geneticamente modificados, contendo genes encontrados em alguns tipos de cancro, podem ser fundamentais para o estudo e compreensão do desenvolvimento da doença e estudo de potenciais novas drogas¹.

3. Células Estaminais Adultas

As células estaminais adultas ou também chamadas de células estaminais somáticas são células indiferenciadas, responsáveis pela manutenção das funções dos tecidos e órgãos onde estão presentes, assim como pela reparação de lesões ou traumas, uma vez que possuem a capacidade de se renovarem e diferenciarem em células especializadas presentes nesses. Estas, como já referido anteriormente, encontram-se em nichos na medula óssea, no fígado, no baço, entre outros órgãos⁵.

Portanto, pode dizer-se, que as células estaminais adultas têm como papel principal a manutenção e reparação dos tecidos onde se encontram.

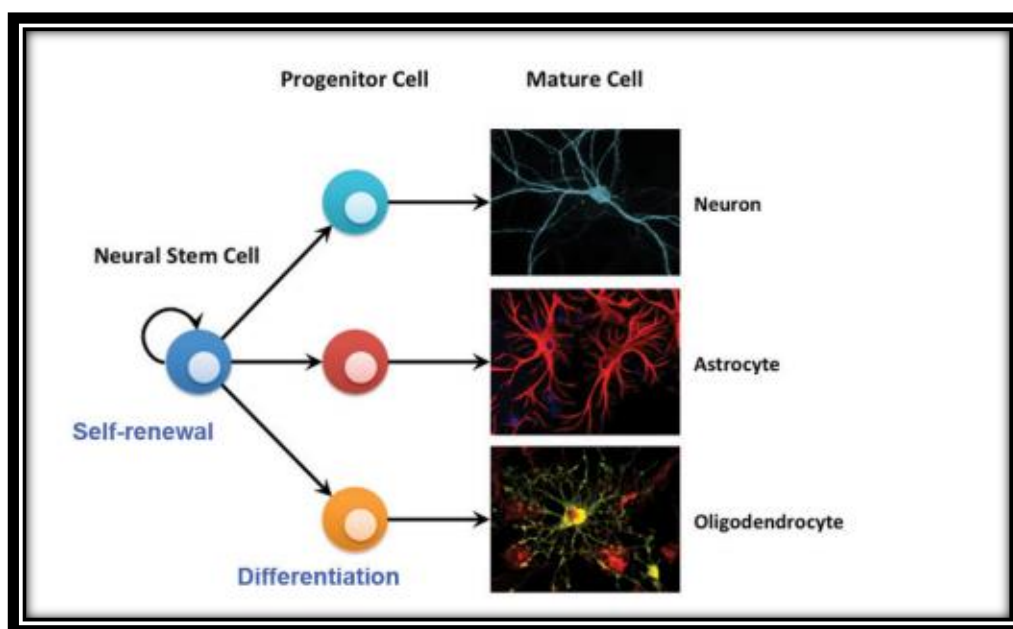


Figura 9 - Diferenciação de uma célula estaminal adulta - célula estaminal neural.

Fonte: http://www.isscr.org/docs/default-source/isscr-publications/isscr_11_stemcellfactbrch_fnl4

Ao contrário das ESCs, que são definidas pela sua origem (embrião na fase de pré-implantação), a origem das células estaminais adultas em determinados tecidos, ainda está a ser investigada.

A descoberta das células estaminais adultas em vários tecidos, abriu portas para o uso das mesmas em transplantes, sendo que há mais de 40 anos que células adultas hematopoéticas da medula óssea, são utilizadas nesse campo. Hoje há evidência que as células estaminais existem no cérebro e no coração, locais onde inicialmente não se esperava que existissem.

Importa reforçar que se a diferenciação das células estaminais adultas poder ser controlada em laboratório, estas células poder-se-ão tornar a base das terapias baseadas em transplantes.

Nos anos 50, foram descobertas duas populações de células estaminais na medula óssea: as **células estaminais hematopoéticas**, responsáveis pela origem de todas as células sanguíneas; e as células estaminais do estroma da medula óssea ou também chamadas de **células estaminais mesenquimais**. Estas células estaminais não hematopoéticas podem dar origem a osso, cartilagem e células adiposas que suportam o sangue e o tecido conjuntivo.

As células estaminais adultas, apesar de estaminais, possuem já algum grau de especialização, ou seja, as células estaminais do sangue do cordão por exemplo, darão origem aos vários tipos de células sanguíneas, e não a neurónios ou a células da pele.

Assim, as células estaminais adultas são células multipotentes, ou seja, possuem uma capacidade restrita a linhagens de células específicas dos tecidos ou órgãos onde se encontram⁴.

A diminuição da população de células estaminais, é característica de algumas doenças como linfomas, leucemias, anemia de Fanconi e de outras doenças que envolvem a destruição de tecidos que deixam de ser regenerados a partir de células estaminais, como é o caso da diabetes tipo 1 (originada pela destruição auto-imune das células pancreáticas beta).

Em alguns casos, há doenças que podem ser tratadas através de transplantes de órgãos. Assim, houve na última década grande interesse no uso de células estaminais adultas na clínica, de modo a gerar células ou tecidos para reconstituir a população de células estaminais e reparar órgãos. A possibilidade de fazer o transplante de células ou tecidos com origem em células estaminais adultas isoladas do próprio paciente, veio reduzir a limitação ao transplante e sua rejeição³.

3.1 Locais e Funções das Células Estaminais Adultas

As células estaminais adultas foram isoladas de inúmeros tecidos e órgãos que incluem a medula óssea, o sangue periférico, o cérebro, o músculo esquelético, o coração, o fígado, o pâncreas, o epitélio da pele e o sistema digestivo, a retina e a córnea, a medula espinal, a polpa dentária, os vasos sanguíneos, entre outros².

Estas células permanecem num estado de quiescência por longos períodos de tempo, até serem activadas por uma necessidade normal de mais células para a manutenção dos tecidos, em casos de doença ou dano.

Uma vez retiradas do organismo, as células estaminais adultas ficam com a capacidade de divisão limitada, pelo que se tenta em laboratório formas de originar células estaminais adultas em culturas celulares em grandes quantidades e manipula-las de forma a que dêem origem a células específicas que possam ser usadas no tratamento de doenças. São exemplos de potenciais tratamentos, a regeneração óssea recorrendo a células estaminais mesenquimais, a produção de células produtoras de insulina para o tratamento da Diabetes *mellitus* tipo 1 e a reparação do tecido cardíaco após uma ataque cardíaco.

3.2 Testes usados na Identificação das Células Estaminais Adultas

Dos métodos utilizados para identificação de células estaminais adultas, fazem parte:

- marcação das células estaminais em tecidos vivos, recorrendo a marcadores celulares e posterior determinação de quais as células especializadas a que deram origem;
- extracção de células de um animal vivo, marcação das mesmas em cultura através de marcadores celulares e transplante para outro animal, com posterior determinação se essas células substituíram ou voltaram a povoar o seu tecido de origem.

3.3 Diferenciação das Células Estaminais Adultas

Num animal vivo, as células estaminais adultas estão preparadas para se dividirem, quando necessário, e originarem células maduras que possuem as características, estruturas especializadas e funções de determinado tecido. Convém salientar, de que tal faz parte de um processo normal de diferenciação.

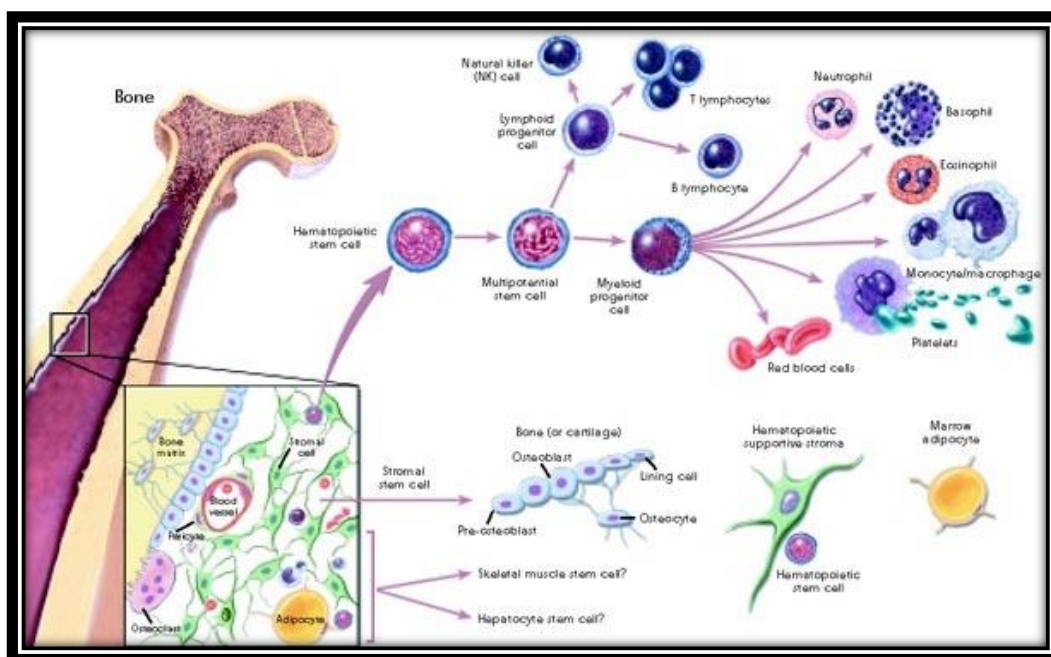


Figura 10 – Exemplos de vias de diferenciação de células estaminais adultas que foram demonstradas *in vitro* e *in vivo*.

Fonte: <http://www.stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics4.aspx>⁴⁷

3.4 Células Estaminais Hematopoéticas

As células estaminais adultas mais bem caracterizadas são as células estaminais hematopoéticas. Estas células originam todas as células sanguíneas tais como os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas.

As células estaminais hematopoéticas estão sobretudo localizadas na medula óssea e no sangue periférico, mas também em alguns órgãos como o baço e o fígado. Também, estão presentes no sangue do cordão umbilical e na placenta.

As células estaminais hematopoéticas são caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície celulares específicos, o que permite o seu isolamento.

As células estaminais imaturas e quiescentes estão situadas na superfície endosteal do osso, onde podem interagir com os osteoblastos que regulam as funções das células estaminais hematopoéticas⁹.

Aquando de lesões dos tecidos, uma rede complexa de factores de crescimento e de citocinas, controlam a transição entre o estado quiescente e o estado activado das células hematopoéticas na medula óssea.

Durante os últimos 50 anos, as células estaminais hematopoéticas foram largamente utilizadas para transplante alogénico e no tratamento de um conjunto de doenças imunes hereditárias ou adquiridas tal como talassemias, anemia de Fanconi, imunodeficiência combinada severa, entre outras. O transplante de células estaminais hematopoéticas é também utilizado no tratamento de doenças malignas como leucemias, síndromes mieloproliferativas, linfomas e tumores sólidos como cancro da mama, cancro do ovário, neuroblastomas e cancro de células renais.

É, no entanto, importante referir que encontrar um dador histocompatível continua a ser uma barreira difícil de ultrapassar para muitos doentes que necessitam deste tipo de procedimento terapêutico.

3.5 Células Estaminais Mesenquimais

As células estaminais mesenquimais são células adultas multipotentes, capazes de se diferenciarem em condrócitos, miócitos, células adiposas, osteoblastos e células do tecido conectivo, estando geralmente presentes nos tecidos conjuntivos de quase todos os órgãos. No entanto, para fins terapêuticos, são mais convenientemente isoladas a partir da medula óssea e do sangue do cordão umbilical.

Embora morfollogicamente semelhantes, as células mesenquimais isoladas de diversas fontes, podem ser funcionalmente diferentes⁹.

As células estaminais mesenquimais possuem uma grande capacidade de expansão em cultura, podendo ser estimuladas a adquirir propriedades específicas.

As células estaminais mesenquimais estão a ser testadas no tratamento de doentes com doença de Crohn, esclerose múltipla, lúpus eritematoso, esclerose lateral amiotrófica e Diabetes *mellitus* tipo 1, devido às propriedades anti-inflamatórias imunomoduladoras que apresentam. Essas propriedades são lhes conferidas através da secreção de factores solúveis e de interacções directas com células do sistema imunológico, suprimindo a actividade de células T citotóxicas, células B e células natural killer.

Adicionalmente, demonstrou-se que as células estaminais mesenquimais têm efeitos benéficos sobre a regeneração de órgãos, criando um ambiente favorável à recuperação funcional das células endógenas dos órgãos e tecidos, promovendo a angiogénese e limitando a remodelação cardíaca^{9,10}.

Em determinadas condições de cultura, foi demonstrada também a capacidade destas células se diferenciarem noutros tipos de células como, por exemplo, cardiomiócitos, células neurais, células pulmonares, células beta das ilhotas pancreáticas. Como tal, estas células estaminais são cada vez mais testadas para um número maior de aplicações em medicina regenerativa.

Em 2008, realizou-se o primeiro transplante de um tecido humano produzido a partir de células estaminais adultas mesenquimais e epiteliais do próprio doente¹¹.

Importa referir que terapias deste tipo eliminam o risco de rejeição dos novos tecidos por parte dos doentes, evitando a necessidade de utilização de medicamentos imunossupressores.

3.6 Células Estaminais Neurais

No hipocampo estão localizados nichos com células estaminais neurais derivadas do sistema nervoso capazes de se auto-renovarem. Estas células são multipotentes, podendo dar origem às três principais linhagens de células do sistema nervoso: neurónios, oligodendrócitos e astrócitos.

Em modelos de lesão cerebral, as células estaminais neurais proliferam nessas regiões neurogénicas, a partir de onde são capazes de migrar para o local da lesão^{9,10}.

Por razões óbvias, a terapia celular autóloga baseada nas células estaminais neurais é de utilização pouco conveniente, já que exigiria a manipulação de tecidos cerebrais. No entanto, foram encontradas células estaminais neurais na polpa dentária, no periodonto e na mucosa olfactiva^{12,13}.

Os neurónios da mucosa olfactiva possuem uma regeneração rápida e contínua, de modo que constituem uma fonte ideal destas células para reparação de lesões da medula espinal e do cérebro¹⁴.

As células estaminais neurais possuem assim, um grande potencial para tratamento de várias doenças neurológicas e neurodegenerativas tais como, a doença de Parkinson¹⁴.

3.7 Células Estaminais Fetais do Cordão Umbilical

As células estaminais do cordão umbilical são células que, consoante a sua proveniência, possuem o potencial de se diferenciarem em células da linhagem hematopoética e mesenquimal. Estas células multiplicam-se mais rapidamente em cultura do que as células homólogas isoladas da medula óssea em organismos adultos. A plasticidade típica destas células faz delas promissoras para a utilização em terapias celulares¹⁵.

As células estaminais do cordão umbilical têm sido utilizadas no tratamento de doenças malignas, como leucemias, linfomas e tumores sólidos, assim como em doenças não malignas como deficiências metabólicas, anemias e imunodeficiências.

O seu potencial terapêutico foi confirmado em modelos animais de diabetes, doenças cardíacas, doenças cerebrovasculares e neuronais. No entanto, a utilidade clínica destas células em doentes humanos ainda se encontra em fase de estudos, e vários ensaios clínicos estão a decorrer para testar o seu efeito regenerativo.

As células do sangue do cordão umbilical contêm, essencialmente, células estaminais hematopoéticas com capacidade para se diferenciarem em células sanguíneas, tal como as células homólogas adultas, células vasculares (endoteliais e do músculo liso), bem como outras linhagens não directamente ligadas ao sistema hematopoético^{9,15}.

Comparativamente aos transplantes de células correspondentes dos organismos adultos, isoladas a partir de medula óssea ou sangue periférico, as células do sangue do cordão umbilical apresentam baixa incidência de rejeição por parte dos doentes transplantados, o que se traduz numa vantagem para a utilização do sangue do cordão umbilical como fonte de células fetais estaminais hematopoéticas para terapia.

Adicionalmente, as células do sangue do cordão umbilical apresentam uma maior disparidade em termos do Complexo Major de Histocompatibilidade, relativamente às células estaminais hematopoéticas da medula óssea, conferindo-lhes assim propriedades para a sua utilização em transplantes.

No entanto, o número relativamente baixo de células estaminais hematopoéticas presentes nas células do sangue do cordão umbilical, limita o uso destas células em doentes adultos, havendo a necessidade de combinar células obtidas de fontes diferentes ou expandir *in vitro*, para o tratamento.

As outras células estaminais principais do cordão umbilical que estão presentes na matriz do cordão umbilical são células estaminais mesenquimais, que constituem uma população de células variada, precursoras de células de osso, cartilagem, tecido adiposo e fibroso conjuntivo, tal como as células estaminais mesenquimais dos organismos adultos¹⁶.

O isolamento das células da matriz do cordão umbilical podem ser facilmente isoladas a partir do subendotélio da veia do cordão umbilical e, microscopicamente podem ser identificadas pela sua morfologia característica, semelhante a fibroblastos que crescem aderentes a uma superfície, e através de marcadores específicos presentes na membrana celular¹⁵.

A característica mais relevante das células estaminais mesenquimais do cordão umbilical, relativamente às células estaminais mesenquimais isoladas de tecidos adultos, é o facto de não possuírem um complexo major de histocompatibilidade completo, o que é de extrema importância quando se trata da compatibilidade entre o receptor e o dador para transplantes alogénicos, tornado a probabilidade de ocorrer rejeição quase nula⁹.

O estabelecimento de bancos públicos de células de sangue do cordão umbilical caracterizadas, poderia permitir uma disponibilização mais fácil e rápida de células estaminais hematopoéticas e células estaminais mesenquimais para transplantes e futuras terapias celulares.

3.8 Células Estaminais de Cancro

As células estaminais de cancro, inicialmente identificadas a partir de leucemias mielóides agudas, apresentam marcadores de superfície distintos das outras células tumorais, igualmente presentes no mesmo organismo e apresentam um potencial de proliferação mais limitado¹⁷.

Admitiu-se, portanto, que as células leucémicas estaminais resultariam da transformação de células estaminais hematopoéticas, tornando-se malignas.

As células leucémicas estaminais encontram-se em quantidades reduzidas nos pacientes, sendo resistentes à quimioterapia e radioterapia, tendo a capacidade de recapitular leucemias mielóides agudas quando transplantadas para ratinhos com deficiência imunológica¹⁷.

Entretanto, foram já caracterizadas outras células estaminais de cancro nomeadamente em tumores sólidos como o cancro da mama, cancro dos ovários, cancro do pulmão, cancro da próstata, glioblastomas, entre outros^{18,19}.

Tendo por base estas observações, foi proposto um modelo de formação do cancro, baseado na existência de células estaminais, segundo o qual, a grande maioria das células num tumor teriam um potencial de proliferação limitado, mas a pequena população de células estaminais de cancro detém a capacidade de auto-renovação e de proliferação. Assim, células estaminais de cancro poderiam originar e manter a massa de células que formam o tumor.

Neste modelo, o cancro é uma doença que envolve a desregulação dos mecanismos de auto-renovação e proliferação das células estaminais normais, através de mutações oncogénicas e outros defeitos epigenéticos¹⁸.

As células estaminais de cancro resistentes à quimioterapia explicam a recorrências de tumores e de metástases, podendo expandir-se dando origem a tumores secundários¹⁹.

Por tudo isto, releva-se importante a identificação dos marcadores de superfície celular das células estaminais tumorais para se proceder ao seu isolamento e expansão em cultura, de modo a serem estudadas as diferenças que existem nas vias de sinalização de células estaminais normais e tumorais. Tal conhecimento poderá levar ao desenvolvimento de medicamentos cujo alvo sejam as células tumorais, sem afectar as células normais e caminhar para terapias mais adaptadas a cada doente.

4. Células Estaminais Embrionárias versus Células Estaminais Adultas

Tanto as células estaminais embrionárias como as células estaminais adultas apresentam vantagens e desvantagens, no que toca ao seu potencial em terapias regenerativas baseadas em células.

Uma das maiores diferenças entre células estaminais embrionárias e células estaminais adultas reside na capacidade do número e tipos de células diferenciadas nas quais se podem tornar.

As ESCs podem originar qualquer tipo de células do organismo, uma vez que são pluripotentes, enquanto que as células estaminais adultas são capazes de se diferenciarem apenas em diferentes tipos de células do seu tecido de origem.

As ESCs crescem com relativa facilidade em cultura, ao contrário das células estaminais adultas, que são raras em tecidos maduros o que torna o seu isolamento por vezes difícil e os métodos através dos quais se consegue obter grande número destas células são ainda limitados. Tal facto é importante, uma vez que é necessária uma grande quantidade de células para terapias de substituição de células estaminais².

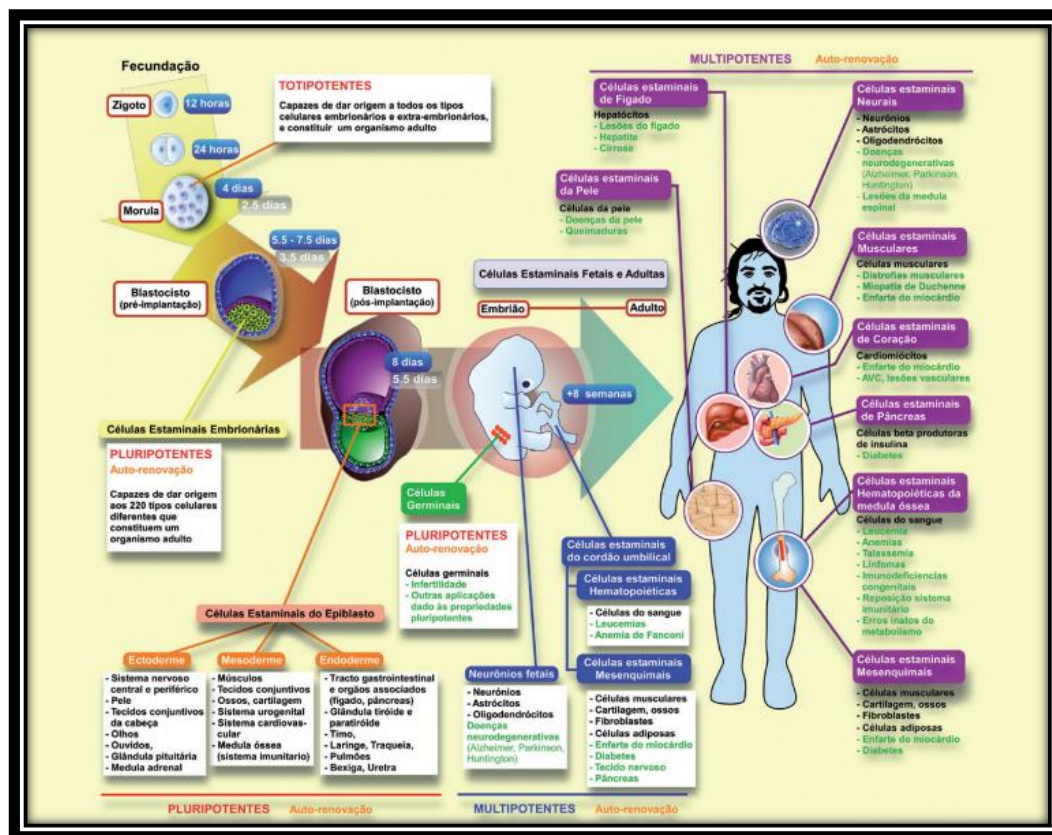


Figura 11 - Fontes de células estaminais embrionárias e células estaminais adultas.

Fonte: Adaptado de Lerou & Daley, 2005³

Outra questão colocada traduz-se no facto de se acreditar que a rejeição de tecidos derivados de células estaminais embrionárias, assim como de células estaminais adultas, diferem quanto à probabilidade de rejeição. Esta surge maior nas primeiras. Isto porque, as próprias células estaminais adultas do doente podem ser expandidas em cultura e diferenciadas em células específicas e novamente introduzidas, o que leva a uma diminuição da rejeição por parte do sistema imunitário do doente.

Em suma, apesar das células estaminais embrionárias se apresentarem, aparentemente, como uma solução vantajosa devido à sua pluripotência natural, capacidade proliferativa e de, teoricamente, apresentarem mais aplicações que as células estaminais adultas, a sua enorme plasticidade e capacidade proliferativa conduzem à propensão de formação de tumores no local alvo ou perifericamente, sob a forma de metástases, quando utilizadas em transplantes^{1,3}.

Também, as dificuldades técnicas em conduzir a diferenciação das células estaminais embrionárias em tipos de células pretendidos, mostra-se um obstáculo.

Por último salienta-se, que as células estaminais adultas são menos propensas à formação de tumores e estão programadas para originar células-filhas, o que permite regenerações ou integrações mais eficazes. No entanto, a menor capacidade de proliferação, de identificação e isolamento, já que existem em pequenas populações celulares no seio dos tecidos e órgão de interesse, revelam-se como desvantagens.

Tabela 1 - Características das células estaminais embrionárias e das células estaminais adultas.

Características	Células Estaminais Embrionárias	Células estaminais adultas
Auto-renovação	Capacidade ilimitada para manter as propriedades estaminais quando se dividem	Capacidade ilimitada para manter as propriedades estaminais quando se dividem
Potencial de diferenciação	Pluripotentes	Multipotentes ou unipotentes (células específicas dos tecidos ou órgãos onde estão localizadas)
Fonte de isolamento	Massa celular interna do epiblasto pré-implantado (células ES) ou pós-implantado (EpiSC)	Tecidos adultos e fetais
Proliferação em cultura	Ilimitada	Limitada
Marcadores específicos	Factores de transcrição Oct 3/4, Nanog, Sox2 Outros: fosfatase alcalina, telomerase	Factores de transcrição: diferentes consoante os tipos celulares mas não há expressão de Nanog e Oct 3/4 Outros: diferentes consoante os tipos celulares mas não há expressão de fosfatase alcalina, telomerase
Vantagens para terapia	Fonte ilimitada de células indiferenciadas e grande capacidade de diferenciação	Fontes autólogas de células, não apresentam considerações éticas, não há riscos de formar teratomas
Limitações para terapias	Considerações éticas, uma vez que são isoladas a partir de embriões, risco de histo-compatibilidades e formação de teratomas	Existem em pequenas quantidades e são difíceis de isolar/caracterizar, com capacidade de diferenciação limitada e amplificação extensiva difícil <i>in vitro</i>

Fonte: Adaptado de Rippon & Bishop, 2004; Lerou & Daley, 2005^{1,3}

5. Reprogramação Nuclear

O cientista John Gurdon em 1962 abriu portas para o estudo de células estaminais quando conseguiu obter com sucesso rãs clonadas⁴⁸.

Gurdon destruiu, através da incidência de radiações ultravioleta, o núcleo do óocito de uma rã (rã A) e transferiu o núcleo de uma célula epitelial intestinal diferenciada (rã B) para o óocito enucleado, conseguindo a criação de rãs clonadas⁴⁸.

Assim, através deste estudo, Gurdon demonstrou que a informação genética necessária para obter as células diferenciadas das rãs permanece intacta no núcleo da célula dadora, tal como a possibilidade de as células epiteliais intestinais serem reprogramadas e passarem novamente para um estado de pluripotência. Este estudo permitiu, posteriormente, a clonagem de mamíferos⁴⁸.

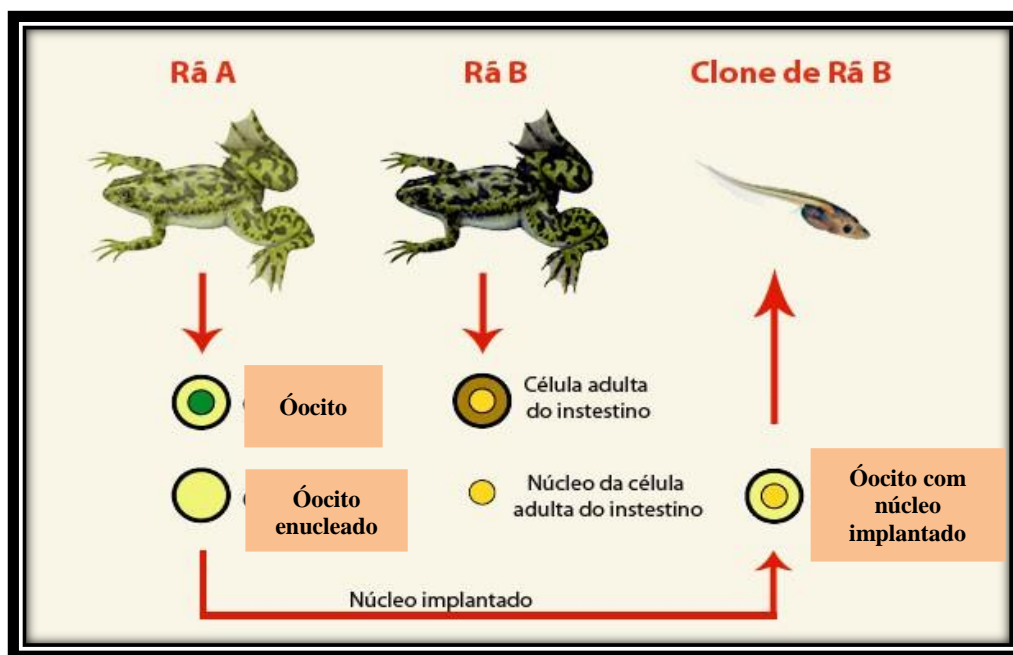


Figura 12 - Reprogramação celular - clones de rãs.

Fonte: Adaptado de Gurdon, 1962⁴⁸

Com o nascimento do primeiro clone mamífero, a ovelha Dolly, provou-se ser possível alterar o estado epigenético de um núcleo diferenciado pela sua integração num óocito enucleado, sendo esta célula híbrida uma célula totipotente que contém o genoma da célula diferenciada original. A técnica utilizada pelo grupo de investigação é apelidada de transferência do núcleo somático (SCNT, do inglês *somatic cell nuclear transfer*)^{20,21}.

A reprogramação nuclear pode então ser definida de forma simplista, como um processo onde o estado de diferenciação de uma célula é modificado para outro estado diferente. Tal, pode envolver a reversão da célula para um estado mais elevado de plasticidade, ou a mudança para outro tipo de célula. Isto quer dizer, que células diferenciadas podem ser reprogramadas para um estado de totipotência, tornando-se capazes de se desenvolver e dar origem a um novo animal adulto²⁰.

Uma vez diferenciadas, as células somáticas, raramente mudam de um estado de diferenciação para outro, pelo que o estado diferenciado das células somáticas é considerado altamente estável. Quando tal ocorre, contudo, é usualmente associado a doenças e, particularmente, desenvolvimento de cancro²².

A reprogramação nuclear veio portanto demonstrar, que o núcleo das células somáticas, não só contém toda a informação genética necessária para a geração de um organismo, como também podem ser rejuvenescidas, por manipulação genética, para adquirir novamente a pluripotência²⁰.

A identidade de qualquer célula é determinada pela expressão de genes de linhagem específica que conferem a identidade à mesma (fenótipo celular). Consequentemente, por forma a mudar uma identidade particular, uma célula tem de activar novos genes de linhagem específica e desactivar os anteriores. Como tal, as mudanças nos padrões de transcrição são fundamentais para o sucesso da reprogramação nuclear, tal como se passa no desenvolvimento normal^{20,22}.

A reprogramação de células somáticas pode ser induzida por diferentes métodos: SCNT, fusão celular e factores de transcrição específicos^{20,22}.

A reprogramação nuclear reveste-se de grande importância, pois permite compreender como a diferenciação celular e a expressão de genes especializados são mantidos, é uma base promissora para o estudo dos mecanismos de inúmeras doenças e descoberta de novos fármacos e terapias de regeneração^{20,21,22}.

6. Células Estaminais Pluripotentes Induzidas (iPSCs)

Entende-se por células estaminais pluripotentes induzidas, células somáticas reprogramadas em células com propriedades semelhantes às das células estaminais embrionárias através da expressão forçada de factores de transcrição. Ou seja, são células que foram reprogramadas para um estado de pluripotência através da introdução de um conjunto específico de factores²³.

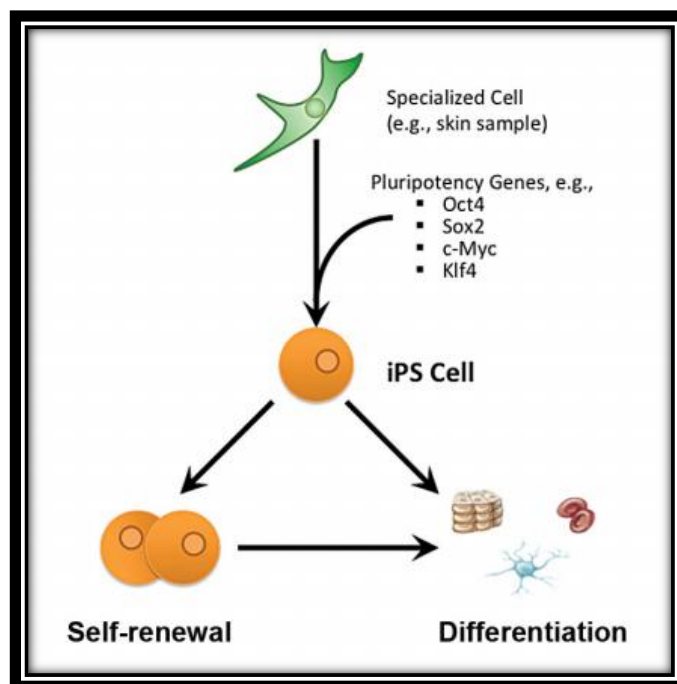


Figura 13 - Reprogramação de células somáticas - iPSCs.

Fonte: http://www.isscr.org/docs/default-source/isscr-publications/isscr_11_stemcellfactbrch_fnl4

As iPSCs são similares às células estaminais, quer na morfologia e expressão de marcadores de pluripotência, quer na capacidade de desenvolver teratomas por injeção em tecidos de animais comprometidos. Podem ser obtidas a partir de fibroblastos, queratinócitos, hepatócitos e células do sangue. Como células estaminais pluripotentes podem diferenciar-se em todas as linhagens celulares, incluindo neurónios, células do sangue e células cardíacas²⁴.

Em 2012, John Gurdon e Shinya Yamanaka, dividiram o Prémio Nobel da Medicina por estudos que mostraram então que as células maduras e especializadas podem ser reprogramadas dando origem a qualquer tipo de tecido.

Já em 2007, o Prémio Nobel tinha sido atribuído aos investigadores Martin J. Evans, Mário R. Capecchi e Oliver Smithies, por estudos também no âmbito das células estaminais.

Takahashi & Yamanaka, em 2006 publicaram, pela primeira vez, o trabalho onde se demonstrou a possibilidade de induzir a reprogramação de fibroblastos de ratinho em células pluripotentes com propriedades semelhantes às células embrionárias, sem recorrer ao uso de embriões²³.

Nesse estudo, as iPSCs foram produzidas através da inserção de quatro genes recorrendo a vírus, que se sabe serem importantes na especialização das células estaminais embrionárias, como será explicado no capítulo seguinte²³.

6.1 O estudo – origem das iPSCs

No estudo levado a cabo por Takahashi & Yamanaka, 2006, foi demonstrada a indução de células estaminais pluripotentes a partir de fibroblastos embrionários ou adultos através da introdução de quatro factores, sob as condições de cultura das células ESCs²³.

Estas células foram designadas por células estaminais pluripotentes induzidas – iPSCs, exibem uma morfologia, propriedades de crescimento e marcadores celulares similares às células estaminais embrionárias, como já foi referido anteriormente²³.

Os investigadores verificaram neste estudo, que transplantação subcutânea das iPSCs para ratinhos *nude*, resultaram em tumores contendo uma variedade de tecidos das três linhas germinativas. Após a injeção em blastocistos, as iPSCs contribuíram para o desenvolvimento embrionário²³.

Foram seleccionados 24 genes candidatos a factores passíveis de induzir pluripotência em células somáticas, tendo por base a hipótese de que tais factores apresentam um papel fundamental na manutenção da identidade das ESCs²³.

Para avaliarem os 24 genes candidatos, desenvolveram um ensaio onde o estado da indução da pluripotência podia ser detectado como a resistência ao G418 (um antibiótico da família dos aminoglicosídeos).

Por recombinação homóloga introduziram uma fusão dos genes de resistência da β -galactosidase e da neomicina, no gene Fbx15 de ratinhos. O gene Fbx15 é dispensável para a manutenção da pluripotência assim como para o desenvolvimento do ratinho, embora seja especificamente expressado nas ESCs e no embrião precoce²³.

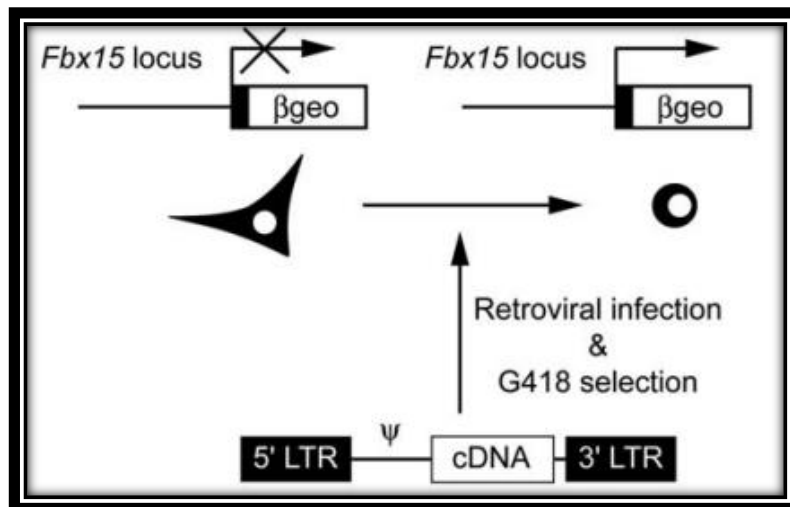


Figura 14 - Estratégia para testar factores de transcrição candidatos a induzir pluripotência.

Fonte: Takahashi & Yamanaka, 2006²³

As células embrionárias homozigóticas para o gene $Fbx15^{\beta_{geo}/\beta_{geo}}$ eram resistentes a altas concentrações de G418, e as células somáticas de ratinho que derivam de $Fbx15^{\beta_{geo}/\beta_{ge}}$ foram sensíveis a concentrações normais de G418. Os investigadores esperavam que mesmo a activação parcial do locus $Fbx15$ resultaria numa resistência a concentrações normais de G418²³.

Introduziram os 24 genes candidatos nos fibroblastos embrionários MEFs (do inglês, “*mouse embryonic fibroblasts*”) do embrião do $Fbx15^{\beta_{geo}/\beta_{geo}}$ por transdução retroviral. Contudo, não obtiveram colónias resistentes ao antibiótico com nenhum factor isolado, o que indicou que nenhum gene candidato foi suficiente para activar o locus de $Fbx15$. Pelo contrário, a transdução dos 24 genes candidatos em conjunto, originaram 22 colónias resistentes a G418²³.

Dos 12 clones para os quais continuaram a cultivar, 5 clones exibiram morfologia semelhante a células embrionárias, incluindo forma redonda, grande nucléolo e escasso citoplasma²³.

Os investigadores repetiram os ensaios e observaram 29 colónias resistentes a G418, de onde escolheram 6 colónias. Quatro destes clones possuíam morfologia e propriedades de proliferação, semelhantes às ESCs²³.

O tempo de duplicação destas células era equivalente ao tempo das células estaminais. Os autores designaram estas células como iPS-MEF24 – células estaminais pluripotentes induzidas por MEFs de 24 factores²³.

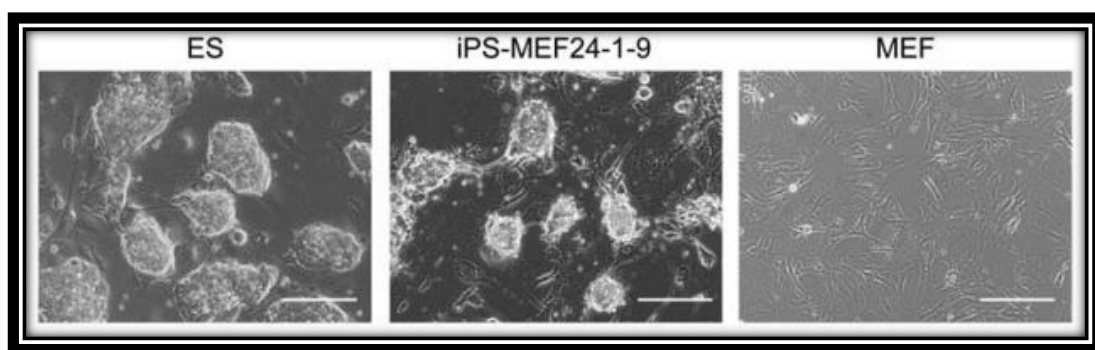


Figura 15 - Morfologia de células estaminais embrionárias, iPSCs (iPS-MEF24) e MEFs.

Fonte: Takahashi & Yamanaka, 2006²³

Os clones iPS-MEF24 expressam marcadores das células ES, incluindo Oct3/4, Nanog, E-Ras, Cripto, Dax1, Zfp296 e Fgf4²³.

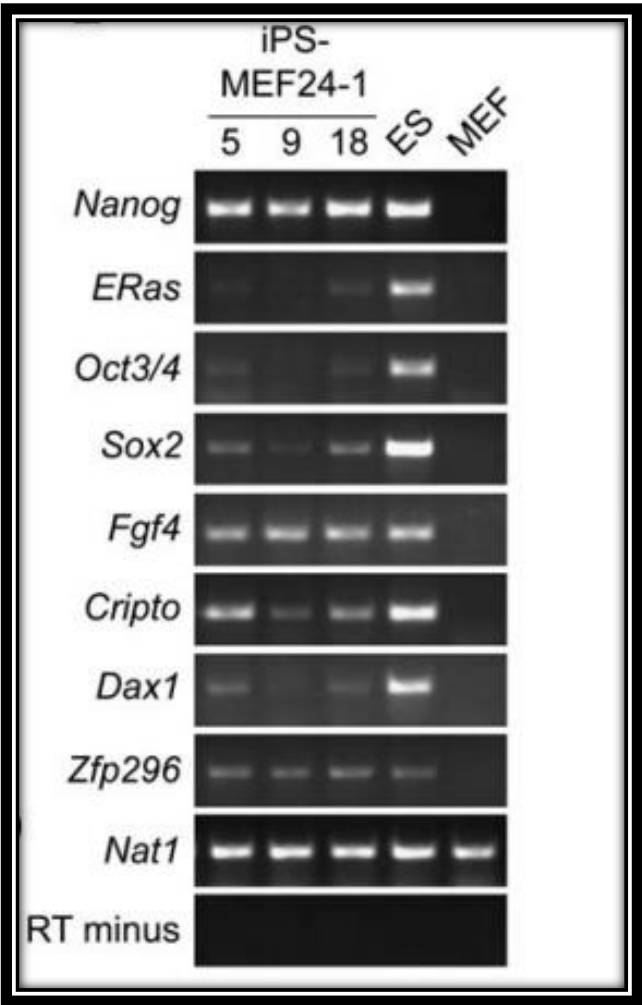


Figura 16 - Análise PCR para marcadores de genes de células estaminais embrionárias em iPS (iPS-MEF 24), células estaminais embrionárias e MEFs. *Nat1* foi usado como controlo.

Fonte: Takahashi & Yamanaka, 2006²³

Tal, permitiu perceber que determinada combinação dos 24 factores candidatos induz a expressão de genes das células ES em culturas MEF²³.

Em seguida, para compreender quais dos 24 genes eram críticos, avaliaram o efeito da retirada de cada factor individualmente na formação de colónias resistentes ao G418. Assim, identificaram 10 factores que, quando combinados sozinhos, são capazes de produzir mais colónias “ES cell-like”, do que os 24 genes produziram²³.

Após estudarem individualmente estes 10 factores, perceberam que o Oct3/4, Klf4, Sox2 e c-Myc, desempenham um importante papel na geração de células iPS de MEFs. A combinação desses 4 factores produz um número de colónias resistentes a G418 similar às observadas com 10 factores²³.

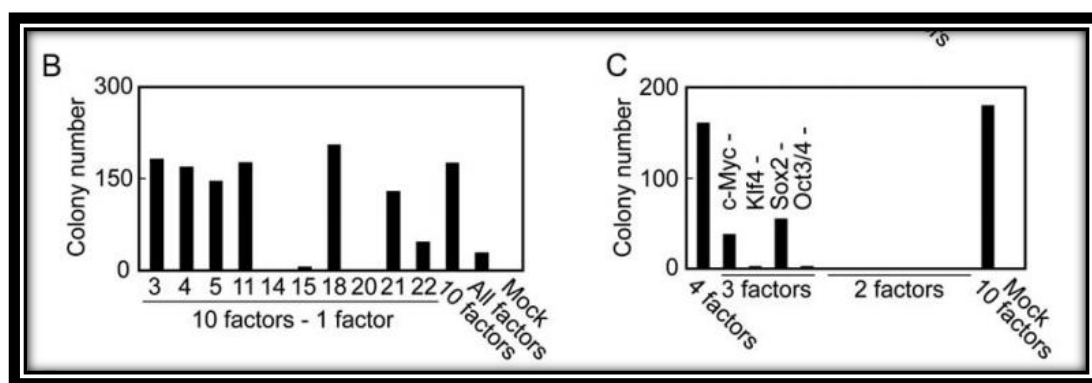


Figura 17 - Efeito da remoção individual de factores, dos 10 factores seleccionados na formação de colónias resistentes a G418.

Fonte: Takahashi & Yamanaka, 2006²³

Foi, desta forma, demonstrado neste estudo pelos investigadores, que as iPSCs podem ser induzidas de culturas MEF pela introdução de 4 factores de transcrição (iPS-MEF4): Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4²³.

Takahashi & Yamanaka, 2006 executaram uma reacção de transcriptase reversa, seguida da reacção da polimerase em cadeia - RT-PCR (do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction*) para perceberem se os marcadores de genes das células ES eram expressados nas iPSCs²³.

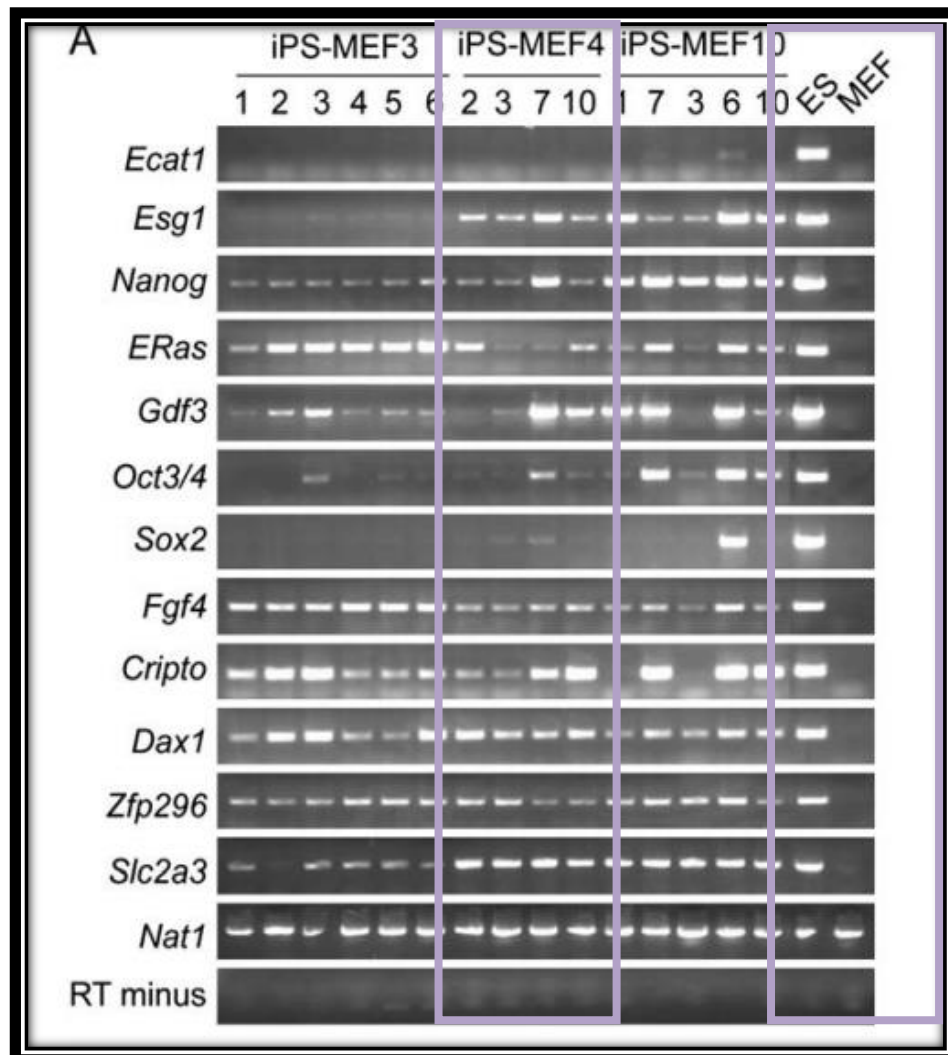


Figura 18 - Análise RT-PCR de marcadores genéticos de células estaminais embrionárias em células iPS, células estaminais embrionárias e MEFs.

Fonte: Takahashi & Yamanaka, 2006²³

Estes resultados demonstraram que as células iPS-MEF4 são similares mas não idênticas às células estaminais embrionárias²³.

Takahashi & Yamanaka, averiguaram a pluripotência das células iPS através da formação de teratomas²³.

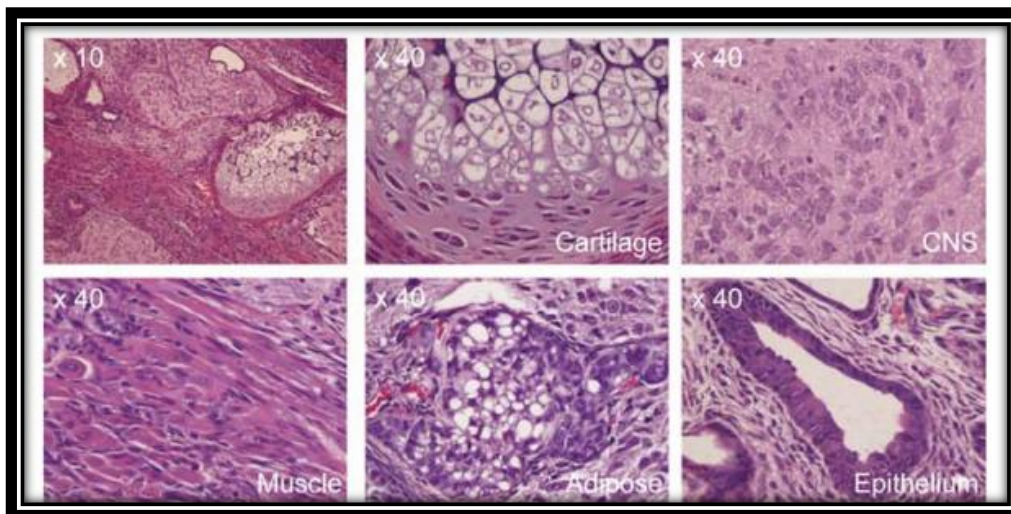


Figura 19 - Vários tecidos presentes em teratomas derivados de células iPS-MEF4.

Fonte: Takahashi & Yamanaka, 2006²³

Foram obtidos tumores com o clone 3 iPS-MEF4 após injeção subcutânea em ratinhos *nude*. O exame histológico revelou que o clone 2 iPS-MEF4 se diferenciou nas 3 camadas germinativas, incluindo tecido neural, cartilagem e epitélio²³.

Por imunofluorescência e RT-PCR, os autores confirmaram a diferenciação em tecido neural e muscular²³.

Com estes dados, demonstrou-se que a maioria dos clones das células iPS-MEF4 exibe pluripotência²³.



Figura 20 – Imunofluorescência. Confirmação *in vitro* da diferenciação nas 3 camadas germinativas (*smooth muscle actin* - marcador para mesoderme; *α-fetoprotein* - marcador para a endoderme; *βIII-tubulin* - marcador para a ectoderme).

Fonte: Takahashi & Yamanaka, 2006²³

Em suma, com este estudo foi demonstrado que os factores Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4 funcionam como factores de transcrição nucleares na manutenção da pluripotência. Também, que o balanço entre o c-Myc e o Klf4 podem ser importantes para a geração das iPSCs²³.

Contudo, não foi ainda clarificado se os quatro factores podem dar origem a células pluripotentes a partir de células somáticas humanas. O uso do c-Myc poderá não ser adequado para aplicações clínicas, e o processo poderá requer ambiente de cultura específico. Não obstante, a descoberta é um passo importante no controlo da pluripotência, o que poderá eventualmente permitir a criação de células pluripotentes directamente a partir de células somáticas de doentes²³.

6.1.1 Notas finais do estudo – origem das iPSCs

As iPSCs são similares às ESCs, crescendo como colónias e expressam marcadores de superfície e nucleares de pluripotência. Também, são capazes de formar teratomas por injeção em tecidos de animais imunocomprometidos, evidenciando o seu potencial de diferenciação nas três camadas germinativas embrionárias, endoderme, mesoderme e ectoderme²³.

As iPSCs de ratinho demonstraram características de pluripotência, incluindo a expressão de marcadores de células estaminais, capacidade de originar tumores constituídos por células pertencentes às três camadas germinativas e capacidade de originarem diferentes tecidos quando injectadas em embriões de ratinho num estadio precoce²³.

Tabela 2 - Características das Células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs).

Características	Células Estaminais Pluripotentes Induzidas
Auto-renovação	Capacidade ilimitada para manter as propriedades estaminais quando se dividem
Potencial de diferenciação	Pluripotentes
Fonte de isolamento	Células somáticas diferenciadas
Proliferação em cultura	Ilimitada
Marcadores específicos	Factores de transcrição: Oct4, Nanog, Sox2 Outros: fosfatase alcalina, telomerase
Vantagens para terapia	Fonte ilimitada de células autólogas indiferenciadas e grande capacidade de diferenciação, não apresentam considerações éticas
Limitações para terapias	Riscos de formação de teratomas e outros cancros devido ao processo de reprogramação

Fonte: Adaptado de Rippon & Bishop, 2004; Lerou & Daley, 2005^{1,3}

6.1.2 Avanços

Em 2007, o grupo de investigadores Takahashi *et al.*, gerou as primeiras iPSCs humanas a partir de fibroblastos, utilizando os mesmos factores de transcrição do estudo de Yamanaka, Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc, demonstrando assim, que iPSCs podem ser originadas a partir de fibroblastos humanos. A caracterização destas células demonstrou, uma vez mais, comportamento semelhante a células estaminais embrionárias²⁵.

Convém referir que as iPSCs não se formam apenas a partir de fibroblastos. Foi demonstrado que a reprogramação de queratinócitos primários por transdução retroviral com os factores de transcrição Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc é 100 vezes mais eficiente e duas vezes mais rápido do que a reprogramação de fibroblastos humanos²⁶.

Os queratinócitos podem ser obtidos a partir do sangue, cabelo ou pele, sendo estas as fontes mais comumente utilizadas para obter iPSCs específicas dos doentes. É de notar, que as células do sangue requerem cuidados mínimos de manutenção para reprogramar, aparecendo colónias em cerca de duas semanas²⁷.

As primeiras iPSCs humanas derivadas da endoderme a partir da reprogramação de hepatócitos primários humanos foram originadas em 2010 pelo grupo liderado por Liu *et al.*, 2010. Até aqui, as iPSCs humanas tinham sido originadas a partir da mesoderme. Neste estudo, demonstraram que as colónias das iPSCs derivadas de hepatócitos aparecem 6 a 9 dias após transdução retroviral com os factores Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc²⁸.

Apesar de, ao longo do tempo, terem sido utilizados diferentes métodos capazes de induzir a expressão dos factores de pluripotência nos vários tipos de células adultas, o método mais utilizado é a transferência de genes através de retrovírus ou lentivírus, utilizando os quatro factores de transcrição que têm sido descritos. Durante a infecção, estes transgenes são integrados de forma estável no genoma sendo, posteriormente, silenciados aquando da formação das iPSCs²⁶.

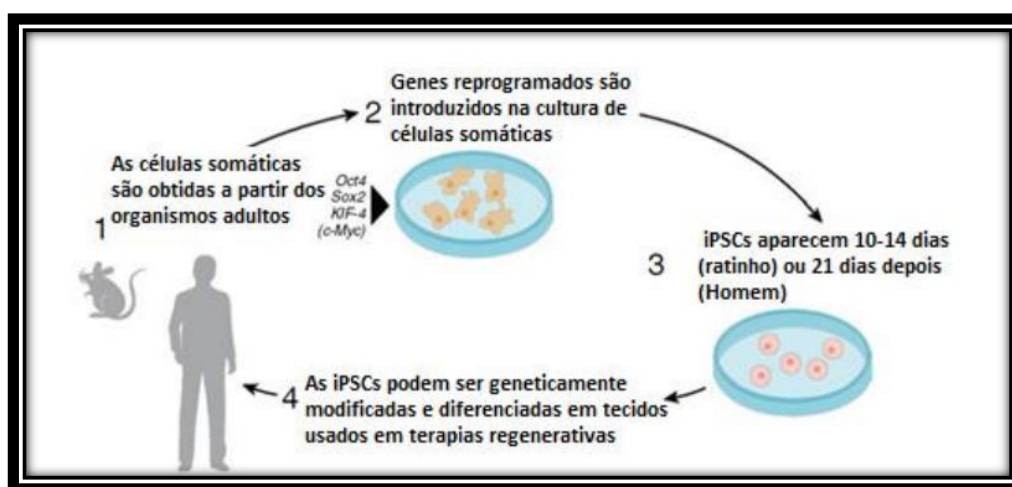


Figura 21 - Esquema representativo de reprogramação e diferenciação de iPSCs (1- células somáticas são obtidas a partir de organismos adultos; 2 – factores de transcrição são introduzidos *in vitro*; 3 e 4 – obtêm-se populações de células pluripotentes que podem ser diferenciadas em diferentes linhagens celulares.

Fonte: Adaptado de Loh, *et al.*, 2009²⁷

No entanto convém referir que a indução de pluripotência por retrovírus ou lentivírus apresenta algumas limitações, como a potencial indução de tumores por mutação insercional e o risco de reactivação do transgene durante a diferenciação das iPSCs. Tal, poderia afectar a identidade da linhagem celular e o comportamento das células derivadas destas²⁹.

6.2 A grande questão: são as iPSCs diferentes das ESCs?

Uma das questões fundamentais a respeito das iPSCs é a de se estas células são diferentes das células ESCs e, caso sejam, se as diferenças são funcionalmente relevantes.

Durante os primeiros anos dos estudos com iPSCs, foi surpreendente a notável similitude com as ESCs. Contudo, em 2009, começaram a ser reportadas diferenças entre iPSCs e ESCs.

Um grupo de investigadores, Chin, *et al.*, 2009 comparou três linhas de células hESCs e cinco linhas de iPSCs, tendo identificado centenas de genes que eram expressos de forma diferente. Concluíram, então, que as iPSCs devem ser consideradas um subtipo único de células pluripotentes⁴⁹.

Dois outros estudos compararam também, a expressão genética global entre ESCs e iPSCs, e identificaram expressões persistentes de genes de células do dador nas iPSCs.

Foi o grupo liderado por Chou, *et al.*, 2011 que reportou, pela primeira vez, que existiam diferenças na metilação do DNA, entre os dois tipos de linhas de celulares estaminais pluripotentes, após terem executado a sequenciação de três clones de ESCs e quatro linhas de iPSCs⁵⁰.

Doi, *et al.*, 2009 também tinha já reportado que existiam genes metilados diferentes, tais como BMP3, entre as ESCs e as iPSCs. Subsequentemente, 3 estudos reportaram memórias epigenéticas de células do dador em hiPSCs⁵¹.

Contudo, outros estudos concluíram que é difícil distinguir iPSCs de ESCs, através da expressão genética ou pela metilação do ADN.

Dois relatórios mostraram que, quer clones de iPSCs, quer clones de ESCs têm variações comuns na expressão de genes. No entanto, crê-se que tais variações são, pelo menos em parte, derivadas das diferentes induções e condições de cultura utilizadas por cada laboratório.

Bock, *et al.*, 2011 demonstraram que ESCs e iPSCs são muito similares na sua expressão genética e metilação de ADN, e que alguns clones de iPSCs não são passíveis de ser distinguidos de ESCs⁵².

Outro ponto de discussão fundamental tem sido quanto à capacidade de diferenciação das células e se as iPSCs são funcionalmente diferentes das ESCs neste domínio.

Os estudos revelaram que existem conclusões difusas relativamente à similaridade entre as duas células.

Em conjunto esses estudos demonstram que clones iPSCs e ESCs têm graus de variação sobrepostos.

Contudo, é possível que clones de iPSCs demonstrem maior variação e que alguns clones sejam diferentes de ESCs na sua expressão genética, metilação de ADN, ou capacidade de diferenciação, sendo notório que alguns clones de iPSCs são indistinguíveis de clones de ESCs.

Em estudos realizados, a única diferença notável entre os métodos executados por laboratórios distintos foi a ordem de factores de reprogramação nas cassetes de expressão, diferença esta que resultou em níveis de Oct3/4 e Klf4 elevados nas células geradas por um dos laboratórios. Estes dados demonstraram que reprogramações imperfeitas ou incompletas, não são um problema fundamental associado às iPSCs. No entanto, as diferenças de qualidade dos clones iPSCs são, em larga medida, derivadas a variáveis técnicas, tais como a combinação de factores e condições de cultura⁵³.

Adicionalmente, alguma variação em clones de iPSCs pode ser atribuída a eventos durante a reprogramação, que não podem ser controlados. Contudo, a avaliação e selecção serão essenciais na identificação de clones iPSCs que serão adequados para aplicações médicas³⁰.

6.3 Aplicação das iPSCs

6.3.1 Modelos de Doença

Como já foi referido anteriormente, células somáticas humanas como fibroblastos, queratinócitos, hepatócitos e células do sangue, podem ser reprogramadas para um estado de pluripotência e, posteriormente, diferenciadas em diferentes linhagens celulares que poderão servir de modelos de doença, estudo e desenvolvimento de novos fármacos e terapia celular.

A possibilidade de modular doenças *in vitro* recorrendo à tecnologia das iPSCs baseia-se na capacidade destas células se auto-renovarem indefinidamente e de originarem qualquer célula do nosso organismo³¹.

Doenças como atrofia espinhal muscular, disautonomia familiar e distrofia muscular, são exemplos de doenças passíveis de modular *in vitro*, uma vez que são doenças associadas à produção insuficiente de proteínas conhecidas e os seus níveis serem passíveis de serem detectados por imunofluorescência³².

Um artigo publicado em 2008 mostrou, pela primeira vez, a possibilidade de obter iPSCs a partir de fibroblastos de indivíduos com doenças genéticas como doença de Parkinson e Huntington, Diabetes *mellitus* e síndrome de Down³³.

Destacam-se, de entre modelos celulares que reproduzem os fenómenos moleculares associados às doenças, as linhas celulares derivadas de tumores, assim como células imortalizadas por introdução de oncogenes. No entanto, estes modelos apresentam limitações uma vez que não permitem reproduzir de forma rigorosa os fenómenos que ocorrem em algumas patologias. Assim, espera-se que as iPSCs, forneçam novos modelos de doença que permitam estudar novas terapias, uma vez que podem ser retiradas células de doentes, reprogramadas em células estaminais induzidas e novamente diferenciadas em inúmeras células, como por exemplo neurónios, o que vai permitir o estudo de doenças como doença de Alzheimer, Parkinson, Machado-Joseph, entre outras³⁴.

As iPSCs específicas de doentes com doenças neurodegenerativas possuem variações genéticas que contribuem para o aparecimento da doença e poderão revelar-se fundamentais para determinar o seu fenótipo³⁴.

Dado o potencial de diferenciação das iPSCs, existe a possibilidade de diferenciação em linhagens celulares do sistema nervoso inacessíveis, que poderão ser a chave para a compreensão dessas doenças neurológicas, assim como o teste de novos fármacos.

Também, as iPSCs poderão ser utilizadas na terapêutica individualizada do doente, permitindo revelar mecanismos sobre o desenvolvimento da doença e definir os fármacos mais apropriados ao doente em causa^{34,35}.

Tabela 3 - Compilação de 22 modelos de doença publicados recorrendo à tecnologia das iPSCs.

Tipo de Doença	Doença	Causa Genética	Tipo Celular	Linha Celular
Neurológicas	Parkinson	Monogénica (mutação LRRK2)	Neurónios dopaminérgicos	hiPSCs
	Esclerose lateral amiotrófica	Poligénica	Neurónios motores	hESC
	Atrofia muscular espinal	Monogénica	Neurónios motores	hiPSCs
	Disautonomia Familiar	Monogénica	Células da crista neural	hiPSCs, hESC
	Ataxia de Friedreich	Monogénica	Não determinado	hESC
	Huntington	Monogénica	Não determinado	hiPSCs, hESC
	Síndrome de RETT	Monogénica	Não determinado	hiPSCs
Hematológicas	Anemia de Fanconi	Monogénica	Células do sangue	hiPSCs, hESC
	Síndrome X frágil	Monogénica	Não determinado	hiPSCs, hESC
	B-talassemia	Monogénica	Células hematopoéticas	hiPSCs
	Mielofibrose primária	Monogénica	Progenitores hematopoéticos (CD34+, CD35+)	hiPSCs

Fonte: Adaptado de Inoue, 2010; Robinton & Daley, 2012^{34,35}

Tabela 4 – continuação da tabela anterior - Compilação de 22 modelos de doença publicados recorrendo à tecnologia das iPSCs.

Tipo de Doença	Doença	Causa Genética	Tipo Celular	Linha Celular
Hepática	Deficiência de alfa 1 anti-tripsina	Monogénica	Hepatócitos	hiPSCs
	Síndrome QT 1 longo	Monogénica	Cardiomiócitos	hiPSCs
	Síndrome QT 2 longo	Monogénica	Cardiomiócitos	hiPSCs
	Síndrome de Leopard	Monogénica	Cardiomiócitos	hiPSCs, hESC
Cardiovasculares	Síndrome de Timothy	Monogénica	Cardiomiócitos	hiPSCs
	Síndrome de Hutchinson Gilford	Monogénica	Células musculares lisas, Células mesenquimais	hiPSCs, hESC
	Distrofia muscular de Duchenne	Monogénica	Não determinado	hiPSCs, hESC
	Síndrome de Prader-Willi	Monogénica	Neurónios	hiPSCs, hESC
Outras	Síndrome de Angelman e Prader-Willi	Monogénica	Neurónios	hiPSCs, hESC
	Síndrome de Down	Monogénica	Neurónios	hiPSCs, hESC
	Retinite Pigmentosa	Poligénica	Células progenitoras da retina e dos fotorreceptores	hiPSCs

Fonte: Adaptado de Inoue, 2010; Robinton & Daley, 2012^{34,35}

Embora sejam necessárias pesquisas adicionais, as iPSCs são já muito úteis no desenvolvimento de fármacos e no modelo de doenças e existe uma forte esperança na sua utilização em transplantes³¹.

A introdução de factores que permitem a reprogramação das células é feita correntemente através de vírus, processo esse que deve ser cuidadosamente controlado e testado, antes de ser utilizado como método no tratamento em humanos. Existem estudos em animais em que os vírus utilizados para introduzir os factores de células estaminais foram responsáveis pelo aparecimento de cancro.

Os tecidos que são originados de iPSCs terão, provavelmente, menos probabilidade de serem rejeitados pelo sistema imunitário. A estratégia das iPSCs origina células estaminais pluripotentes que, juntamente com outros estudos de outros tipos de células estaminais pluripotentes, ajudará na aprendizagem de como reprogramar células para reparar tecidos danificados no organismo³¹.

Assim, é hoje possível reprogramar células somáticas para regressarem ao seu estado de células estaminais embrionárias recorrendo à introdução de genes. Assim, uma fonte de células específicas do dador pode ser gerada, aumentando a chance de haver compatibilidade no uso dessas células na regeneração de tecidos³⁵.

6.3.2 Screening de fármacos Medicamentos

Actualmente, o modelo de desenvolvimento de novos medicamentos não se revela totalmente eficiente, uma vez que a resposta aos medicamentos é avaliada em modelos animais, e nem sempre permite aferir com rigor a sua eficácia no Homem³¹.

A tecnologia das iPSCs poderá replicar os tipos celulares específicos das doenças e permitir a realização de testes e ensaios, de modo a escolher o medicamento mais eficaz e com menor toxicidade. Também, o uso das hiPSCs poderá ser uma mais-valia para a redução do número de animais sacrificados durante a fase de desenvolvimento e avaliação de novos medicamentos³¹.

Muitos dos estudos com hiPSCs para a avaliação de novos medicamentos têm sido realizados no campo das doenças neurológicas como a doença de Alzheimer e Parkinson, atrofia muscular espinal e disautonomia familiar^{34,35}.

O uso da tecnologia das iPSCs como plataforma para a descoberta de novos medicamentos requer várias etapas:

- Recrutamento de um grupo de doentes para biópsia da pele ou recolha de amostras de sangue. É necessário o consentimento do doente para o uso das iPSCs na descoberta e comercialização de novos medicamentos.
- Obtenção de iPSCs e sua criopreservação em biobancos;
- Diferenciação das iPSCs derivadas dos doentes nas células que são afectadas pela doença em estudo;
- Descoberta do fenótipo da doença;
- Preparação das condições do ensaio de acordo com o fenótipo da doença³².

Portanto, o processo de descoberta de novos medicamentos tem início nas células somáticas do doente que são utilizadas para obter iPSCs³².

As células do doente são isoladas e, em seguida, expandidas e depois reprogramadas em iPSCs. Estas são diferenciadas nas células de interesse que desempenham um papel importante na doença em estudo. O processo é seguido pela caracterização, expansão e armazenamento das iPSCs em biobancos³².

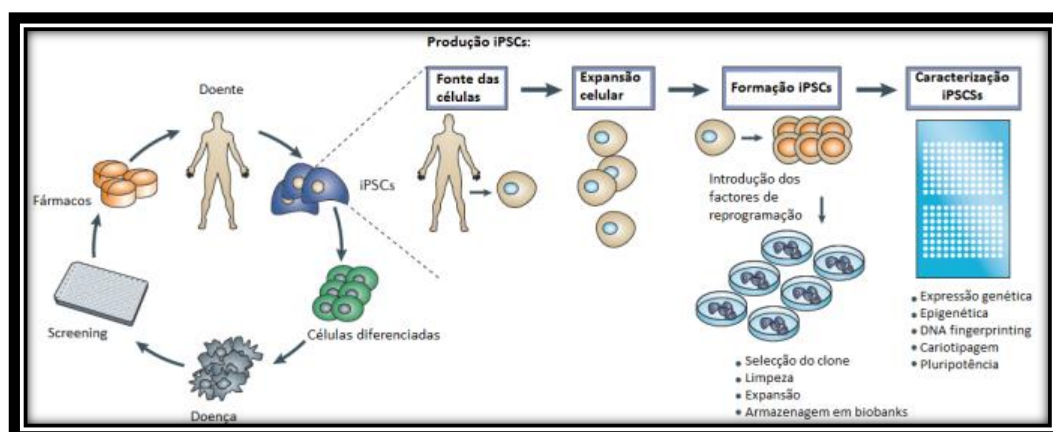


Figura 22 - Modelo integrado para descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos baseado na tecnologia das iPSCs.

Fonte: Adaptado de Grskovic, *et al.*, 2011³²

A escolha da fonte de células para obtenção de iPSCs pode depender também da diferenciação nos tipos celulares que reflectem o fenótipo da doença. No entanto, os fibroblastos têm sido as células mais utilizadas para a reprogramação devido às características que apresentam. São fáceis de obter através da punção da pele anestesiada localmente, fáceis de armazenar e manusear e apresentam elevado rendimento na obtenção de iPSCs³².

Convém referir que a identificação de marcadores celulares que possam prever o potencial de diferenciação das iPSCs contribuirá para uma selecção mais rápida e eficaz das linhas celulares que apresentam maior qualidade.

Um dos obstáculos na aplicação de iPSCs no desenvolvimento de novos medicamentos é a dificuldade em conseguir que a diferenciação nas células específicas da doença em estudo seja executada em larga-escala³².

O desenvolvimento de bancos de iPSCs poderá reduzir o tempo de preparação das células e permitirá obter culturas celulares disponíveis para investigação³².

6.3.3 Terapia Celular

Um dos desígnios mais promissores da tecnologia da iPSCs reside no facto da sua possível aplicação em medicina regenerativa. A substituição das zonas lesadas de um determinado órgão ou tecido sem desencadear reposta imunológica e dispensar o uso de terapêutica imunossupressora, e sem haver a possibilidade de formação de doenças secundárias como cancro, a partir das células inoculadas, é um dos objectivos desta tecnologia³⁵.

Espera-se que as iPSCs possam a vir utilizadas em transplantes e terapia celular superando o problema da rejeição, mediante a utilização de células do próprio doente. A criação de iPSCs específicas de doentes tem sido motivada pela possibilidade de obter células e tecidos imunocompatíveis para transplante autólogo³⁵.

Em doenças genéticas, após correcção do defeito por reparação génica, será possível produzir células saudáveis para transplante. Tal foi já utilizado com sucesso num modelo animal de anemia de Fanconi³⁶.

Por tudo isto, as iPSCs apresentam vantagens clínicas quando comparadas com as células estaminais embrionárias, já que o genoma das iPSCs coincide com o genoma do doente a partir do qual são derivadas, diminuindo o risco de rejeição durante o processo de transplante. As iPSCs obtidas são isogénicas para o doente e não possuem a mutação causadora da doença^{35,36}.

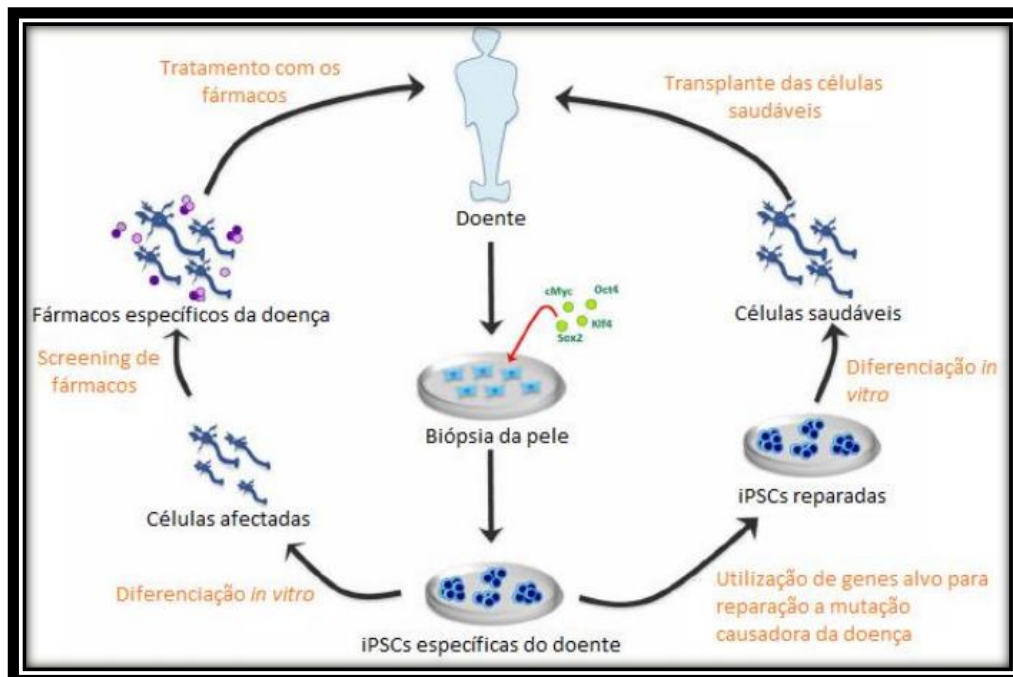


Figura 23 - Diversas aplicações das iPSCs.

Fonte: Adaptado de Robinton & Daley, 2012³⁵

6.3.4 Alguns Trabalhos Desenvolvidos com iPSC.

Desde da descoberta das iPSCs que se tem vindo a explorar o seu potencial para aplicação em medicina regenerativa, nomeadamente para o tratamento de doenças como Parkinson, deficiência em plaquetas, danos na espinal medula, degeneração macular, entre outras³⁰.

No seguimento dos estudos seminais liderados por George Daley e Kevin Eggan, mais de cem relatórios foram publicados nos últimos três anos, utilizando iPSCs específicas de doenças.

Verificou-se que as iPSCs específicas derivadas de doentes podem ser utilizadas para recapitular fenótipos não só de doenças monogénicas, mas também de doenças poligénicas de início tardio, como doença de Parkinson, doença de Alzheimer e esquizofrenia.

Hargus, *et al.*, 2010, obtiveram hiPSCs a partir de doentes com a doença de Parkinson, com mutações nos genes PINK I e LLK2. Estas células hiPSCs foram diferenciadas em células neurais e, em seguida, procederam à análise da função mitocondrial. A disfunção mitocondrial em hiPSCs derivadas de células neurais de doentes com Parkinson pode ser corrigida com coenzima Q10, rapamicina e inibidor da cinase LLK2. Tal sugere que o resgate farmacológico das funções mitocondriais nestas células pode resultar num possível tratamento desta doença³⁸.

Este grupo de investigadores diferenciou iPSCs de doentes com Parkinson em neurónios dopaminérgicos e mostraram que estes neurónios podiam ser transplantados, sem sinais de neurodegeneração para cérebros de roedores adultos³⁸.

Também, na doença de Alzheimer, as iPSCs específicas de doentes com esta doença, revelaram ser promissora. A doença de Alzheimer trata-se de uma doença neurodegenerativa caracterizada pela formação do peptídeo β -amiloide. As hiPSCs específicas de doentes com esta doença foram diferenciadas em neurónios que expressam marcadores e também precursores do peptídeo β -amiloide³⁹.

As células diferenciadas são capazes de sintetizar este peptídeo. A produção de peptídeo β -amiloide pode ser inibida, não só pelos inibidores de β -secretase e γ -secretase, como também pelo sulfeto de sulindac, um anti-inflamatório não esteróide. Este sistema será viável para testar possíveis medicamentos utilizados no tratamento desta doença³⁹

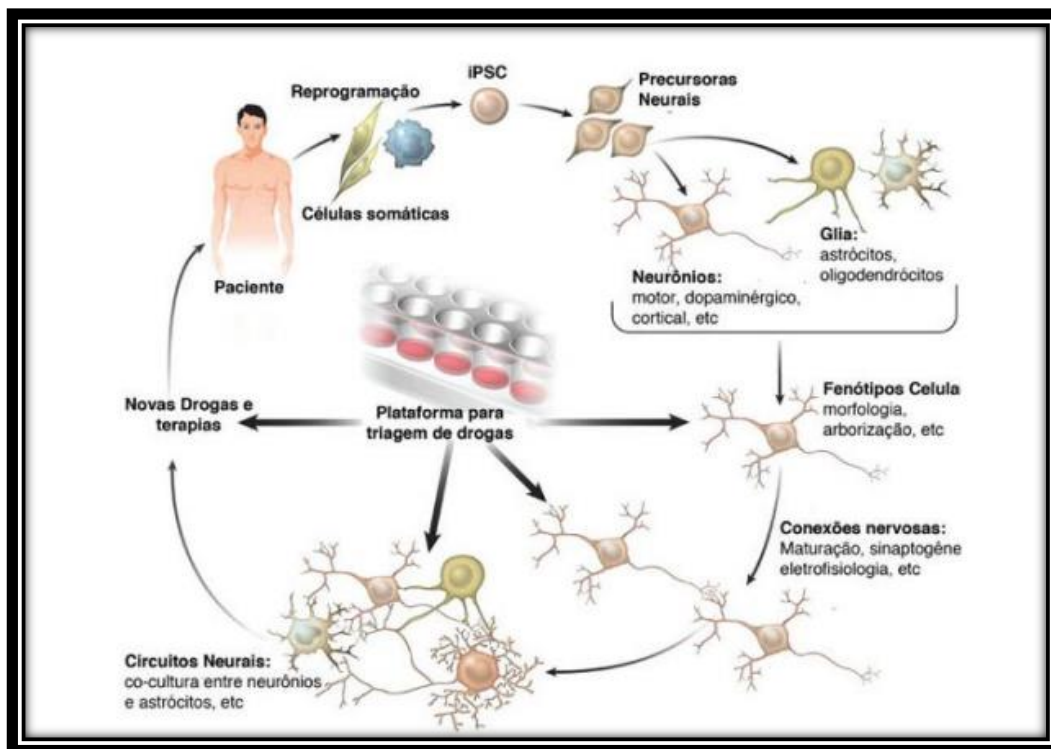


Figura 24 - Modelação de doenças neurológicas utilizando a tecnologia das iPSCs.

Fonte: Adaptado de Marchetto, et al., 2009⁴⁰

As iPSCs revelaram-se igualmente auspiciosas em doenças genéticas. Um grupo de investigadores mostrou que, na correcção do defeito genético, as células somáticas de doentes com anemia de Fanconi, podem ser reprogramadas para o seu estado de pluripotência – iPSCs específicas destes doentes. Estas linhas celulares apareceram indistinguíveis das células estaminais embrionárias e das iPSCs de indivíduos saudáveis. Ainda, demonstraram que as iPSCs específicas corrigidas dão origem a progenitores hematopoéticos das linhagens mielóide e eritróide fenotipicamente normais, ou seja, livres de doença⁴¹.

Também, células somáticas derivadas de iPSCs, em particular cardiomiócitos e hepatócitos, podem ser usadas para testes toxicológicos e revelarem-se uma alternativa às abordagens existentes³⁰.

Dada a capacidade limitada de regeneração do coração humano após um episódio de um enfarte do miocárdio, cardiomiócitos derivados de hiPSCs revelaram-se uma promissora fonte de células para o tratamento de reposição.

Também, mostraram recapitular os fenótipos de doentes com doenças cardiovasculares monogénicas, o que se revela importante para testar modelos de doença cardiovasculares *in vitro* como plataformas de validação de novas drogas⁴².

O grupo de investigadores Zhang, *et al.*, 2009 concluiu que células hiPSCs podem diferenciar-se em cardiomiócitos funcionais, sendo as iPSCs uma opção viável como fonte de células autólogas na reparação cardíaca e uma ferramenta poderosa na investigação cardiovascular⁴³.

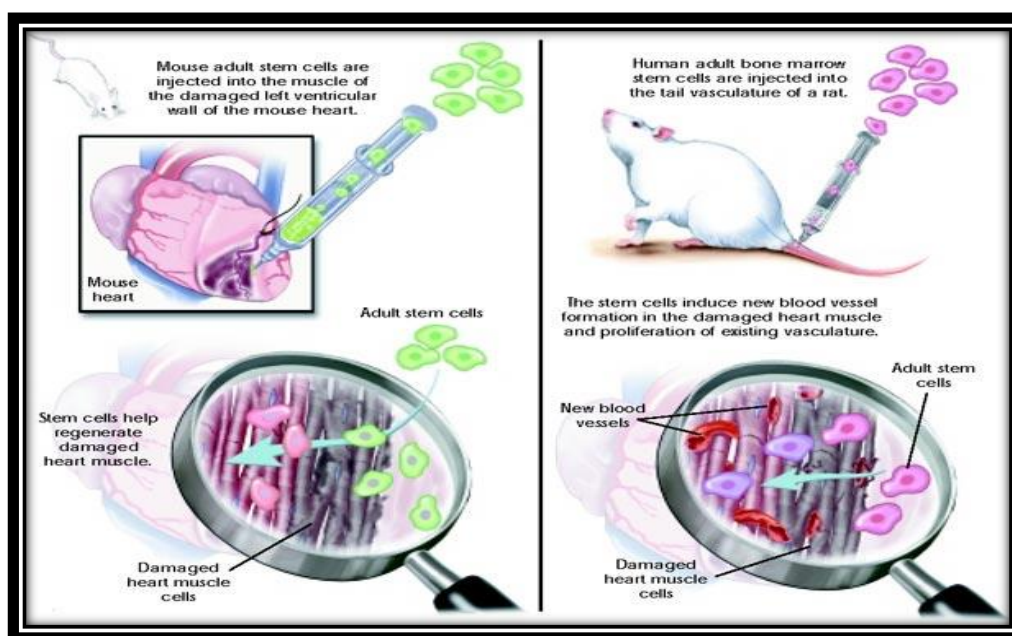


Figura 25 - Estratégias para reparação do músculo cardíaco recorrendo a células estaminais adultas.

Fonte: http://www.isscr.org/docs/default-source/isscr-publications/isscr_11_stemcellfactbrch_fnl4

Um outro estudo mostrou que iPSCs de ratinho poderão diferenciar-se em hepatócitos funcionais *in vitro*, o que pode revelar-se promissor no desenvolvimento de hepatócitos para transplantes e *screening* de novas substâncias. Também foi demonstrado nesse mesmo estudo, que as iPSCs de ratinho retêm o potencial para o desenvolvimento de fígado fetal⁴⁴.

Adicionalmente a estas aplicações médicas, as iPSCs podem ser utilizadas para biotecnologia animal. As iPSCs de macaco, porco e cão, podem ser utilizadas para engenharia genética nestes animais, permitindo a geração de modelos de doença e a produção de substâncias como enzimas, que estão em quantidades deficientes em algumas doenças genéticas. Esta mesma tecnologia poderá vir a ser potencialmente útil também na preservação de espécies.

Nakauchi, *et al.*, 2010, reportaram a geração de um pâncreas de rato num ratinho, através da microinjecção de iPSCs de rato em blastocistos de ratinho deficientes num gene essencial para o desenvolvimento desse órgão. Tal poderá vir a sustentar uma estratégia similar para o desenvolvimento de órgãos para transplantes humanos⁵⁴.

7. As células iPSCs resolvem os problemas éticos
acerca da investigação das células estaminais
embrionárias?

Foi demonstrado que as iPSCs originadas a partir de ratinho podem ser inseridas num embrião, onde contribuem para o crescimento do animal. As células estaminais pluripotentes induzidas humanas, em teoria, podem dar origem a um novo embrião²¹.

Embora tal ainda não tenha sido realizado utilizando células humanas, o facto gera controvérsia na comunidade científica, já que alguns cientistas entendem que é inaceitável o uso em investigação de células capazes de gerar uma nova vida.

Se as células estaminais embrionárias humanas possuem este “estatuto moral”, uma vez que contribuem para um embrião humano sob determinadas condições, então as hiPSCs deverão possuir o mesmo estatuto. Alguns cientistas entendem, que as hiPSCs não resolvem as discussões acerca do uso de células embrionárias na investigação, uma vez que a tecnologia das iPSCs foi desenvolvida baseada no conhecimento obtido do estudo das hESCs.

As diferenças mais contestadas nas terapias baseadas em hESCs e hiPSCs, dizem respeito à segurança do doente, eficácia do tratamento, acessibilidade a um grande número de doentes e a controvérsia ética acerca do “estatuto moral” das células.

Todas estas questões são eticamente relevantes e não possuem respostas definitivas. A investigação em ambas as células, hESCs e hiPSCs, está em rápido desenvolvimento e devem as questões éticas ser reavaliadas constantemente.

7.1 Informar os Doentes

Frequentemente se ouvem notícias acerca de tratamentos promissores com células estaminais que são realizados em clínicas de todo o mundo. Torna-se por isso importante, definir e esclarecer um conjunto de pontos aos doentes que depositam a esperança da cura da sua doença neste tipo de tratamento.

A Sociedade Internacional para Pesquisa de Células Estaminais (ISSCR, do inglês *International Society for Stem Cell Research*), uma organização de pesquisa de células estaminais sem fins lucrativos, que assume o compromisso de garantir que a informação acerca da pesquisa com células estaminais é dada aos doentes de uma forma segura, eficaz e justa, está preocupada com o facto de as terapias com células estaminais estarem a ser vendidas em todo o mundo antes de terem sido provadas como seguras e eficazes⁴⁵.

As terapias com células estaminais são ainda novas e encontram-se numa fase experimental. Nestas fases iniciais, é preciso ter em conta que as terapias podem não funcionar e que, inclusivamente, pode haver desvantagens. Como tal, é importante que o doente entenda o que procura antes de considerar uma terapia com células estaminais⁴⁵.

As maiorias das descobertas médicas são baseadas em vários anos de pesquisas realizadas em universidades e empresas. Há um longo percurso a percorrer, até que uma terapia seja aprovada como segura e eficaz. Assim, tal como um novo medicamento, as terapias com células estaminais devem ser avaliadas e atender a certos padrões antes de receber a aprovação dos órgãos reguladores nacionais a serem utilizadas para tratar doentes⁴⁵.

A variedade de doenças para as quais existem tratamentos comprovados baseados em células estaminais ainda é reduzida. Distúrbios do sangue e sistema imune e a perda da função da medula óssea podem, em alguns casos, ser tratados de forma eficaz com o transplante de células estaminais hematopoéticas.

É importante referir que outros tratamentos com células estaminais são ainda experimentais, o que significa que ainda não foi demonstrado que este tratamento é seguro e eficaz. Para a maioria das doenças, ainda está a ser determinado quais as células que irão funcionar e ser eleitas para a reparação de um tecido ou órgão e, consequentemente, de uma doença em particular⁴⁵.

Além disso, é fundamental entenderem-se os efeitos adversos a longo prazo, uma vez que as células transplantadas irão permanecer no organismo dos doentes por toda a vida. Portanto, é crucial uma monitorização atenta destes doentes.

Os doentes que poderão vir a integrar um programa de tratamento seja ensaio clínico ou não, deverão receber um formulário de consentimento, onde devem constar todas as informações relativas a esse mesmo tratamento, onde se salienta a natureza não comprovada do tratamento e identifica os riscos específicos associados a novas terapias com células estaminais. Este documento deve ser lido e entendido pelo doente, e só deve ser assinado caso todas as dúvidas tenham sido esclarecidas⁴⁵.

O formulário de consentimento informado deve incluir:

- que o ensaio envolve pesquisa e porque a pesquisa está a ser feita;
- o que é o estudo do tratamento e se é um estudo randomizado;
- qual a possibilidade de receber diferentes tratamentos (placebo ou tratamento alternativo);
- que outras opções médicas existem;
- o que está envolvido na pesquisa antes, durante e após o tratamento;
- quem irá realizar o estudo;
- quanto tempo irá durar o estudo;
- os riscos do tratamento;
- as responsabilidades do doente e informações quanto aos seus direitos de confidencialidade do processo clínico;
- o direito do doente ser informado de quaisquer novas informações que possam afectar a decisão de continuar a participar no estudo;
- as circunstâncias em que poderá ser o doente retirado do estudo;
- o direito do doente se retirar a qualquer momento sem consequências;
- quantos doentes estão envolvidos⁴⁵.

É importante, no entanto, salientar que nenhum tratamento está isento de riscos e é considerado 100% seguro.

Outro ponto importante que o doente deve ter em conta, é se o tratamento em causa está aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), no caso dos Estados Unidos da América, ou pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA)⁴⁵.

Em suma, o doente antes de integrar qualquer estudo ou ensaio clínico que envolva células estaminais, deve procurar informar-se junto da instituição e equipa médica que o segue, para que não corra riscos de integrar falsos estudos que podem colocar em risco a sua vida⁴⁵.

8. Importância das iPSCs: Perspectivas Futuras

Em 2006, foi demonstrado que células estaminais com propriedades similares às células estaminais embrionárias podiam ser geradas a partir de fibroblastos de ratinho, através da introdução de quatro genes. A estas células foi então dado o nome de células estaminais pluripotentes induzidas – iPSCs – foco desta monografia²³.

Em 2007 foi reportado que uma abordagem semelhante era aplicável a fibroblastos humanos e, através da introdução de um conjunto de factores, hiPSC podiam ser geradas. No mesmo dia, foi também reportado a geração de iPSCs humanas, utilizando uma diferente combinação de factores³⁰.

Segundo Yamanaka, os estudos futuros deverão focar-se na capacidade das iPSCs formarem novos tecidos, órgãos e “organismos-modelo”. Considera, também, que a tecnologia das iPSCs está agora preparada para inúmeras aplicações, incluindo a terapia com células estaminais³⁰.

A partir de cada procedimento de indução, emergiram múltiplos clones de iPSCs de diversas qualidades. Torna-se, portanto essencial, seleccionar bons clones para aplicação médica o que talvez se consiga de marcadores expressão génicos. Contudo, deve confirmar-se *in vitro* a propensão para diferenciação e a integridade do genoma³⁰.

Para uso alargado das iPSCs, poderá ser necessário estabelecer *stocks* de clones de iPSCs qualificados, provindos de voluntários saudáveis ou de stocks de sangue de cordão.

Outro aspecto importante é a imuno-rejeição que poderá ser diminuída caso se gere iPSCs de dadores HLA-homozigóticos.

A tecnologia iPSCs terá provavelmente um impacto substancial não só na ciência, mas também na economia e na política. Contudo, as iPSCs devem ser avaliadas estritamente pelos dados científicos, e esses dados deverão ser profundamente considerados pela sua relevância em potenciais aplicações clínicas das células³².

Convém referir que, apesar dos progressos que têm sido conseguidos, ainda existem desafios que têm de ser ultrapassados de modo a tirar partido de todas as potencialidades que as iPSCs poderão oferecer. Talvez, a padronização e a utilização de protocolos mais uniformes e controlos rigorosos dos mesmos, aumentarão a solidez experimental e poderão permitir a obtenção de linhas células padronizadas que poderão ser utilizadas com confiança em investigações³⁵.

As linhas celulares obtidas devem ser controladas, de modo a detectar aberrações cromossómicas que poderão ocorrer aquando do cultivo das iPSCs³⁰.

A criação de plataformas com iPSCs humanas para o estudo da fisiopatologia das doenças, para a avaliação de potenciais agentes terapêuticos e para estabelecimento de fontes sustentáveis destas células para uso em medicina regenerativa, deverão ser direcções tidas em conta no avanço científico.

Para Yamanaka, os cientistas devem focar-se na investigação, e os políticos e negócios deverão confiar nas evidências geradas por estudos científicos para traçar futuras direcções³⁰.

9. Conclusão

As células estaminais embrionárias apresentam grande potencial para o desenvolvimento de novas terapias celulares, dada a sua capacidade de proliferar de maneira eficaz em cultura e possibilidade única de dar origem a todas as células e a todos os tecidos que constituem um organismo¹.

Assim, sob condições específicas, as ESCs poderiam ser utilizadas para a formação de tecidos em laboratório, que serviriam para transplante em doentes com tecidos ou órgãos danificados. Apesar disso, além dos problemas técnicos ligados às condições de manutenção e de diferenciação eficiente das ESCs para os tipos celulares pretendidos, subsistem problemas éticos que têm sido um obstáculo ao estudo e desenvolvimento de metodologias para aplicação em clínica destas células^{2,7,9}.

A utilização de células estaminais adultas em medicina encontra-se numa fase mais avançada, já que a sua utilização levantou menos problemas éticos. Apesar destas células apresentarem menor plasticidade e capacidade de proliferação relativamente às células estaminais embrionárias, e tal representar uma limitação quanto à possibilidade de expansão em cultura que garanta a obtenção de bancos de células necessários às terapias celulares, o facto de não terem associados a elas a formação de tumores, revela-se um factor positivo. É importante relembrar a associação das ESCs à formação de teratomas¹⁸.

Outro facto que importa referir, é que as células estaminais adultas estão presentes em pequenas quantidades e são difíceis de isolar e caracterizar, pelo que o uso deste tipo de células está dependente do órgão-fonte. No entanto, a possibilidade de isolamento de determinadas células estaminais adultas do doente, permite a sua utilização em condições autólogas, limitando por isso a necessidade de imunossupressão.

Actualmente, as células estaminais isoladas da medula óssea apresentam uma maior prevalência de utilização em terapia, uma vez que são células mais fáceis de isolar e identificar e de proliferarem em cultura. Apesar disso, nos últimos anos, as células estaminais do sangue do cordão umbilical tornaram-se uma fonte alternativa, e muitas vezes preferida, de células estaminais hematopoéticas para doentes sem dadores de medula óssea compatíveis e para crianças^{9,15}.

Estas células apresentam grande plasticidade e são menos imunogénicas do que as células estaminais hematopoéticas da medula óssea e são facilmente isoladas a partir do cordão umbilical. Por este motivo, estas células têm sido armazenadas e conservadas por criopreservação em bancos de instituições públicas e privadas, para possibilitar e facilitar o uso destas células de sangue do cordão umbilical em terapias⁹.

A reprogramação de células do seu estado diferenciado para um estado de pluripotência, provou tratar-se de uma ferramenta promissora²⁰.

As primeiras investigações na área da reprogramação celular, lideradas pelo investigador Yamanaka, vieram surpreender a comunidade científica, uma vez que quebraram o dogma de que células especializadas do corpo humano teriam entidade vitalícia. A expressão forçada de um grupo de factores de transcrição – Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc – têm a capacidade de redireccionar a identidade de células especializadas e induzi-las ao estadio embrionário pluripotentes. A estas células deram o nome de células estaminais induzidas pluripotentes – iPSCs²³.

A reprogramação de células somáticas em iPSCs, que apresentam um potencial semelhante ao das ESCs, vieram superar quase todas as preocupações éticas ligadas à origem embrionária das hESCs e vieram impulsionar novos estudos para a utilização de células pluripotentes em terapia^{20,23}.

As iPSCs oferecem também a possibilidade de novos tratamentos terapêuticos autólogos com células reprogramadas a partir de células somáticas do próprio doente. Importa salientar, no entanto, que é ainda necessário melhorar os processos de reprogramação e de diferenciação destas células.

Para além do uso potencial das iPSCs em terapias celulares, estas também oferecem uma oportunidade para estudar e modelizar os acontecimentos e mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da doença, através da reprogramação de células somáticas de doentes com doenças como, por exemplo, a Diabetes *mellitus* tipo 1.

Também, podem ajudar na gestão de doenças de forma personalizada para o doente, permitindo conhecer mecanismos da doença e, assim, ajudar na definição de medicamentos mais apropriados e direccionados para o combate da doença.

Assim, espera-se que as iPSCs possam ser usadas para a formação de tecidos que podem servir para transplante em doentes com tecidos ou órgãos danificados. A sua utilização em condições autólogas limita a necessidade de imunossupressão, ultrapassando o problema da rejeição, uma vez que se recorre à utilização de células do próprio doente³¹.

Por último, as iPSCs são importantes na descoberta de novos medicamentos e na modulação da doença. Estas células podem servir “cobaias” para testar a segurança e eficácia de novos medicamentos. Populações homogéneas de células diferenciadas, a partir de iPSCs, poderão ser utilizadas para testar os efeitos farmacológicos, específicos para cada tecido. Estas populações celulares poderão, também, ser originadas a partir de células isoladas de doentes que sofram de determinada doença e serem fundamentais na descoberta de novos medicamentos úteis no tratamento da doença, bem como na compreensão dos seus mecanismos patológicos^{35,36}.

Concluindo, a reprogramação das células adultas em iPSCs vai certamente contribuir para um rápido progresso na utilização de células estaminais pluripotentes em terapias futuras.

Os esforços actuais para a compreensão dos mecanismos moleculares e biológicos que estão na base da proliferação e diferenciação celular, para estabelecer métodos mais seguros e eficazes para o isolamento, purificação e caracterização das células estaminais ou células derivadas, vão contribuir para o desenvolvimento de terapias celulares cada vez mais audaciosas nos próximos anos. A grande esperança reside no facto de doenças e lesões incuráveis até agora, deixarem de ser com o tratamento baseado em células estaminais.

O progresso da investigação no domínio das iPSCs, veio demonstrar o seu enorme potencial e adquiriu uma enorme relevância científica, social e económica, já que contribuiu para o conhecimento de processos fundamentais, como os mecanismos de desenvolvimento e regeneração dos organismos vivos e revelou o seu potencial que promete revolucionar várias áreas, como transplantes, descoberta de novos medicamentos, identificação dos mecanismos de doença e o seu tratamento.

Mesmo com os problemas técnicos que ainda têm de ser ultrapassados, nomeadamente no que toca à segurança e eficácia das iPSCs, espera-se que a sua utilização venha aportar benefícios inimagináveis em medicina humana e tornar doenças incuráveis em curáveis.

10. Referências Bibliográficas

1. Rippon, H. J., & Bishop, A. E. (2004). Embryonic stem cells. *Cell Proliferation*, 37(1), 23-24.
2. Nirmalanandhan, V. S., & Sittampalam G. S. (2009). Stem Cells in Drug Discovery, Tissue Engineering, and Regenerative Medicine: Emerging Opportunities and Challenges. *Journal of Biomolecular Screening*, 14(7), 755-768.
3. Lerou, P. H., & Daley, G. Q. (2005). Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Reviews*, 19(6), 321-331.
4. International Society For Stem Cell Research (ISSCR) (2011). Stem Cell Facts. *Website* acedido em 08 de agosto de 2015, em http://www.isscr.org/docs/default-source/isscr-publications/isscr_11_stemcellfactbrch_fnl.
5. Smith, A. H. (2010). Pluripotent stem cells: private obsession and public expectation. *EMBO Molecular Medicine*, 2(4), 113-116.
6. Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., Gardner, R. L., & McKay, R. D. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 448(7150), 196-199.
7. Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & Development*, 19(19), 1129-1155.
8. Nagy, A., & Vintersten, K. (2006). Murine embryonic stem cells. *Methods in Enzymology*, 418, 3-21.
9. Mimeault, M., Hauke, R., & Batra, S. K. (2007). Stem Cells: A Revolution in Therapeutics Recent Advances in Stem Cell Biology and Their Therapeutic Applications in Regenerative Medicine and Cancer Therapies. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 82(3), 252-264.

10. Brignier, A. C., & Gewirtz, A. M. (2010). Embryonic and adult stem cell therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 336-344.
11. Macchiarini, P., Jungebluth, P., Go, T., Asnaghi, M. A., Rees, L. E., Cogan, T. A., Dodson, A., Martorell, J., Bellini, S., Parnigotto, P. P., Dickinson, S. C., Hollander, A. P., Mantero, S., Conconi, M. T., & Birchall, M. A. (2008). Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*, 372 (9655), 2023-2030.
12. Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., & Shi, S. (2002). Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal Dental Research*, 81(8), 531-535.
13. Silvério, K. G., Benatti, B. B., Casati, M. Z., Sallum, E. A., & Nociti, F. H. Jr. (2008). Stem Cells: Potential Therapeutics for Periodontal Regeneration. *Stem Cell Reviews*, 4(1), 13-19.
14. Kim, S. U., & Vellis, J. (2009). Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: A review. *Journal of Neuroscience Research*, 87(10), 2183-2200.
15. O'Donoghue, K., & Fisk, N., M. (2004). Fetal stem cells. *Best Practice and Research, Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18(6), 853-875.
16. Walther, G., Gekas, J., & Bertrand, O. F. (2009). Amniotic stem cells for cellular cardiomyoplasty: Promises and premises. *Catheterization and Cardiovascular Interventions: Official Journal of the Society for Cardiac Angiography and Interventions*, 73 (7), 917-924.
17. Dick, J. E. (2005). Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Annals of the New York Academy Sciences*, 1044, 1-5.
18. Wang, J. C., & Dick, J. E. (2005). Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends in Cell Biology*, 15(9), 494-501.

19. Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., & Kirchner, T. (2005). Migrating cancer stem cells an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 5(9), 744-749.
20. Gurdon, J. B., & Melton, D.A. (2008). Nuclear reprogramming in cells. *Science*, 322(5909), 1811-1815.
21. Wilmut, I., Schnieke, A. E., Mcwhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385 (6619), 810-813.
22. Halley-Stott, P. R., Pasque, V. & Gurdon, J. B. (2013). Nuclear reprogramming. *Development*, 140(12), 2468-2471.
23. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663-676.
24. Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, 318(5858), 1917-1920.
25. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861-872.
26. Aasen, T., Raya, A., Barrero, M. J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarík, V., Tiscornia, G., Edel, M., Boué, S., & Izpisua Belmonte, J. C. (2008). Efficient and Rapid Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Keratinocytes. *Nature Biotechnology*, 26(11), 1276–1284.

27. Loh, Y. H., Agarwal, S., Park, I. H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G. C., Kim, K., Miller, J. D., Ng, K., & Daley, G. Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*, 113(22), 5476-5479.
28. Liu, H., Ye, Z., Kim, Y., Sharkis, S., & Jang, Y. Y. (2010). Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology: Official Journal of the American Association for the Study of Liver Diseases*, 51(5), 1810–1819.
29. Yu, J., Chau, K. F., Vodyanik, M. A., Jiang, J., & Jiang, Y. (2011). Efficient Feeder-Free Episomal Reprogramming with Small Molecules. *PLoS One*, 6(3), 1-10.
30. Yamanaka, S. (2012). Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell*, 10(6), 678-684.
31. Young, W., D'Souza, S. L., Lemischka, I. R., & Schaniel C. (2010). Patient-specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Platform for Disease Modeling, Drug Discovery and Precision Personalized Medicine. *Journal of Stem Cell Research and Therapy*, 10(10), 1-14.
32. Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B., & Daley, G. Q. (2011). Induced pluripotent stem cells – opportunities for disease modeling and drug discovery. *Nature Reviews, Drug Discovery*, 10(12), 915-929.
33. Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K., & Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134(5), 877-886.
34. Inoue, H. (2010). Neurodegenerative disease-specific induced pluripotent stem cell research. *Experimental Cell Research*, 316(16), 2560-2564.

35. Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381), 295-305.
36. Raya, A., Rodríguez-Pizà, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M. J., Consiglio, A., Castellà, M., Río, P., Sleep, E., González, F., Tiscornia, G., Garreta, E., Aasen, T., Veiga, A., Verma, I. M., Surrallés, J., Bueren, J., & Izpisua Belmonte, J. C. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, 460(7251), 53-59.
37. Gao, A., Peng, Y., Deng, Y., & Qing, H. (2013). Potential therapeutic applications of differentiated induced pluripotent stem cells (iPSCs) in the treatment of neurodegenerative diseases. *Neuroscience*, 228, 47-59.
38. Hargus, G., Cooper, O., Deleidi, M., Levy, A., Lee, K., Marlow, E., Yow, A., Soldner, F., Hockemeyer, D., Hallett, P. J., Osborn, T., Jaenisch R., & Isacson, O. (2010). Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(36), 15921-15926.
39. Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., Yamanaka, S., Okano, H., & Suzuki, N. (2011). Modeling Familial Alzheimer's disease with Induced Pluripotent Stem Cells. *Human Molecular Genetics*, 20(23), 4530-4539.
40. Marchetto, M. C., Yeo, G. W., Kainohana, O., Marsala, M., Gage, F. H., & Muotri, A. R. (2009). Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, 4(9), 1-12.

41. Raya, A., Rodríguez-Pizà, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M. J., Consiglio, A., Castellà, M., Río, P., Sleep, E., González, F., Tiscornia, G., Garreta, E., Aasen, T., Veiga, A., Verma, I. M., Surrallés, J., Bueren, J., & Izpisua Belmonte, J. C. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, 460(7251), 53-59.
42. Sharma, A., Wu, J. C., & Wu, S. M., (2013). Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for cardiovascular disease modeling and drug screening. *Stem Cell Research and Therapy*, 4(6), 1-8.
43. Zhang, J., Wilson, F. G., Soerens, G. A., Koonce, H. C., Yu, J., Palecek, P. S., Thomson, A. J., & Kamp, J. T. (2009). Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation Research*, 104(4), 1-24.
44. Zhang, Q., Yang, Y., Zhang, J., Wang, G. Y., Liu, W., Qui, D. B., Hei, Z. Q., Ying, Q. L., & Chen, G. H., (2011). Efficient derivation of functional hepatocytes from mouse induced pluripotent stem cells by combination of cytokines and sodium butyrate. *Chinese Medical Journal*, 124(22), 3786-3793.
45. International Society For Stem Cell Research (ISSCR) (2008). Guidelines for the Clinical Translation of Stem Cells. *Website* acedido em 01 de Setembro de 2015, em <http://www.isscr.org/docs/guidelines/isscrglclinicaltrans.pdf>.
46. Yamanaka, S. (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 1(1), 39-49.
47. National Institutes of Health (NIH) (2015). Stem Cell Information. *Website* acedido em 02 de setembro de 2015, em <http://www.stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics4.aspx>.

48. Gurdon, J. B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 10(4), 622-640.
49. Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., & Zhang, J. (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*, 5(1), 111-123.
50. Chou, B. K., Mali, P., Huang, X., Ye, Z., Dowey, S. N., Resar, L. M., Zou, C., Zhang, Y. A., Tong, J., & Cheng, L. (2011). Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Research*, 21(3), 518–529.
51. Doi, A., Park, I. H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M. J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., & Loewer, S. (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nature Genetics*, 41(12), 1350–1353.
52. Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z. D., Ziller, M., Croft, G. F., Amoroso, M. W., & Oakley, D. H. (2011). Reference maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell*, 144(3), 439–452.
53. Guenther, M. G., Frampton, G. M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2010). Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7(2), 249–257.

54. Nakauchi, H., Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Hamanaka, S., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Ibata, M., Sato, H., Lee, Y. S., Usui, J., Knisely, A. S., & Hirabayashi, M. (2010). Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell*, 142(5), 787-799.

11. Anexo: Relatório de Estágio

11.1 Agradecimentos

Agradeço ao Dr. Nuno Lopes a oportunidade da realização deste estágio e todo o conhecimento transmitido.

Ao Dr. João Paredes, agradeço toda a disponibilidade e incentivo.

À Dra. Dolores Lima, agradeço a colaboração e ajuda neste percurso.

A toda a equipa do laboratório que me acolheu e ajudou, expresso o meu sincero agradecimento.

11.2 Resumo

O presente relatório tem por objectivo descrever as actividades que desenvolvi durante o meu estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas.

O estágio foi realizado no laboratório de análises clínicas do Hospital Dr. Francisco Zagalo em Ovar, onde tive oportunidade de contactar com os diferentes sectores – bioquímica clínica, hematologia, coagulação/hemostase, imunologia/serologia e microbiologia – e entender a dinâmica e rotinas de um laboratório de análises clínicas inserido em ambiente hospitalar.

No presente relatório tentarei abordar, de forma sucinta, as análises efectuadas em cada sector e retratar a realidade do laboratório e o dia-dia dos seus profissionais.

11.3 Abstract

This report describes the activities developed during my internship on clinical analysis on behalf of my Master Course in Clinical Analysis.

The internship took place in the clinical analysis laboratory at Hospital Dr. Francisco Zagalo in Ovar, where I had the opportunity to interact with different sectors – clinical biochemistry, hematology, coagulation/hemostasis, immunology/serology and microbiology – and understand a clinical analysis laboratory dynamic in hospital environment.

I will try to approach, in a resumed way, the undertaken clinical analysis in each sector and describe the laboratory reality and its professionals daily routine.

11.4 Introdução

O presente relatório tem por objectivo descrever as actividades desenvolvidas durante o meu estágio no laboratório de análises clínicas do Hospital Dr. Francisco Zagalo (HFZ) em Ovar.

Durante esse período, tive a possibilidade de aprofundar os meus conhecimentos em diversas áreas como bioquímica clínica, hematologia e hemostase, microbiologia e imunologia/serologia, e compreender a dinâmica de um laboratório de análises clínicas inserido em ambiente hospitalar.

O laboratório de análises clínicas do HFZ encontra-se dividido em 4 sectores principais: o sector da imunologia/serologia e hemostase, o sector da bioquímica clínica e hematologia, o sector da microbiologia e o sector das colheitas e de atendimento ao público.

Ainda, das suas instalações fazem parte o gabinete do director de serviço, um vestiário dos técnicos e um quarto de banho de serviço.

A equipa é constituída por uma farmacêutica especialista, 5 técnicos de análises clínicas, uma administrativa e uma assistente operacional.

Ao longo deste relatório, descreverei as etapas mais importantes de todo o ciclo analítico, visando as áreas nas quais tive oportunidade de desenvolver as minhas actividades.

11.5 Fase pré-analítica

A fase pré-analítica é a primeira etapa de todo o ciclo analítico e revela-se fundamental, uma vez que um erro introduzido nesta fase compromete todas as fases seguintes podendo originar, nos casos mais graves, diagnósticos errados que comprometem a vida do doente/utente.

Esta fase compreende o pedido inicial das análises clínicas a serem efectuadas, a colheita de sangue, a triagem e finaliza com a separação das amostras para os diferentes sectores.

A identificação de todos os produtos biológicos que dão entrada no laboratório é feita através de uma etiqueta com um código de barras único, e que permite a comunicação dos resultados analíticos para o sistema informático. Tal, contribui para a redução da ocorrência de erros pré-analíticos.

A administrativa do laboratório, é responsável pela introdução dos dados de identificação dos doentes, assim como dos parâmetros a analisar no *software* informático de gestão do laboratório - *Sislab* –, e pela posterior impressão do código de barras que identificará cada um dos tubos de colheita de cada doente.

No caso dos utentes externos, após efectuar a sua admissão aguardam a sua vez na sala de espera para o efeito, respeitando a ordem de chegada. Doentes diabéticos, doentes possuidores de declaração de incapacidade e grávidas, dispõem de atendimento prioritário.

As colheitas são efectuadas pelos Técnicos de Análises Clínicas que são responsáveis pela confirmação dos dados constantes na requisição emitida pela administrativa, garantindo assim, a correcta identificação dos utentes. Em cada tudo de colheita é colada o respectivo código de barras e que permitirá que o tubo seja processado e lido nos respectivos aparelhos.

No caso dos doentes internados, as etiquetas com os códigos de barra são enviadas previamente para os serviços, de acordo com a requisição *on-line* das análises solicitadas e são os enfermeiros os responsáveis pelas colheitas dos produtos biológicos.

O horário de colheitas está estabelecido das 8h30 às 13h00. No entanto, verifica-se que a maior afluência de utentes ocorre até às 11h30.

As amostras provindas do internamento, está estabelecido que deverão chegar até às 11h30. Excluem-se os pedidos urgentes que poderão dar entrada no laboratório dentro do período de funcionamento, ou seja, até às 20h.

11.5.1 Sistemas de colheita

As colheitas de sangue no laboratório do HFZ são efectuadas com o Sistema Fechado Monovette®. Para casos especiais como em crianças ou veias de difícil punção, utiliza-se o sistema *butterfly*.

O técnico ao utilizar este sistema *butterfly* não necessita de segurar a agulha durante a punção, o que facilita o processo. Contudo, este método apresenta algumas desvantagens devido ao baixo calibre da agulha, o que poderá causar hemólise dos eritrócitos e aumentar a probabilidade de formar coágulo.

Nas colheitas utilizam-se diversos tubos, com diferentes anticoagulantes, específicos para cada determinação analítica. Mais à frente neste relatório, irei abordar os diferentes anticoagulantes, assim como os diferentes tubos de colheita, utilizados no laboratório.

Durante o meu estágio tive oportunidade de efectuar colheitas, uma vez que considereei que seria uma mais valia aportar este conhecimento.

11.5.2 Procedimento de colheita de sangue venoso

Aquando do procedimento da colheita de sangue venoso, existem um conjunto de etapas que o profissional de saúde que a efectua deve respeitar e ter em conta. Assim, no laboratório do HFZ está instituído proceder-se da seguinte forma:

- ° Identificação do utente – é necessário confirmar sempre a requisição e comprovar que os dados correspondem ao utente, perguntando o nome e data de nascimento;
- ° Preparação do material para a punção: prepara-se previamente o material necessário à colheita, o que inclui, luvas, tubos, agulha, garrote, algodão com álcool. Nesta fase também se seleccionam os tubos que vão ser usados e colam-se as etiquetas de identificação da amostra;
- ° Preparação do utente: coloca-se o doente de forma confortável solicitando que estenda braço eleito para a punção e que feche a mão sem fazer força;
- ° Aplicação do garrote: o garrote utiliza-se para aumentar o volume das veias, para isso coloca-se a cerca de 10 cm acima da zona a puncionar. O garrote deve ser aplicado suavemente de forma a não apertar a pele utente. A duração da aplicação do garrote não deve exceder 2 minutos, pois pode ocorrer infiltração de sangue nos tecidos circundantes se a pressão for demasiado elevada, conduzindo a resultados falseados. Para que isso não ocorra deve-se soltar o garrote quando o sangue começa a fluir para o primeiro tubo;
- ° Inspeção e selecção da zona de punção: a punção pode ser feita em qualquer das veias na zona da fossa ante cubital, antebraço ou nas costas da mão. Para a punção na fossa ante cubital devem-se examinar a veia mediana cubital, a veia basilíca e a veia cefálica. Para a punção nas costas das mãos devem-se examinar as veias metacarpianas;

° Desinfecção da zona de punção: a zona da punção deve ser limpa com álcool realizando movimentos concêntricos, começando pela zona da punção até ao exterior, é importante não voltar a tocar no local desinfectado.

Uma vez aplicado o desinfectante, é importante que se deixe secar bem já que o excesso de álcool que fica no braço pode provocar hemólise e, também, causar ardor ao utente no momento da punção.

° Punção: o bisel da agulha deve estar sempre virado para cima. A punção deve ser feita o mais rapidamente possível de modo a não ser dolorosa para o utente. Deve-se puxar o êmbolo do tubo até ao fim para que o tubo encha de sangue, e retirar aquando do enchimento do tubo, e voltar a colocar outro se necessário e conforme o número de análises a efectuar. Este processo deve ser firme de modo a não mover a agulha da veia.

° Extracção da agulha: quando a colheita está próxima de terminar, retira-se completamente o garrote e num movimento rápido, retira-se a agulha e coloca-se no contentor amarelo para objectos cortantes. Pressiona-se o local com algodão, solicitando ao utente que esteja uns minutos a pressionar o local para evitar formação de hematoma, até que estanque o sangue. Por fim coloca-se um penso rápido.

11.5.2.1 Problemas relativos à punção venosa

Por vezes, aquando da punção venosa, o sangue não flui normalmente após puxar o êmbolo do tubo. Este facto pode dever-se ao bisel da agulha não estar completamente inserido na veia (o fluxo de sangue abrandar, até parar causando um hematoma). Para corrigir, deve-se introduzir mais profundamente a agulha na veia.

Também, tal pode ocorrer, pelo facto de a agulha ter atravessado a veia (há pulverização breve de sangue no tubo), devendo-se retroceder ligeiramente a agulha.

Ainda, pode verificar-se o caso de a veia se ter movido no acto da punção, ou não se ter acertado na veia (não há fluxo sanguíneo). Neste caso, deve-se apalpar a veia com a outra mão e corrigir a posição da agulha.

Por último, pode dar-se o caso de o bisel da agulha se ter aderido à parede interna da veia (há saída de pequenas gotas de sangue). Neste caso, deve-se girar ligeiramente o corpo de extracção (agulha + tubo) até que se restabeleça o fluxo.

Sobretudo quando alguns destes problemas acontecem deve-se procurar primeiro descansar o utente e perceber se o procedimento lhe está a causar dor e, caso não esteja, continuar calmamente o procedimento.

No decorrer da minha experiência nas colheitas, tive casos como os descritos acima. Tentei, portanto, sempre ter em conta o bem-estar do utente em primeiro lugar, e proceder de acordo com a situação em causa. Pontualmente, foi necessário efectuar uma segunda punção.

11.5.3 Procedimento de colheita de hemoculturas

As hemoculturas recepcionadas no laboratório do HFZ provêm dos serviços de internamento. Por norma, a recolha das hemoculturas são efectuadas pelos enfermeiros do serviço cumprindo, no entanto, o estabelecido pelo laboratório.

Estão, então, estabelecidos os seguintes passos:

- ° Rotular os frascos com os dados do doente e marcar o nível de volume desejado;
- ° Retirar a parte plástica da tampa e desinfetar a superfície com álcool a 70%;
- ° Colocar o garrote no paciente (cerca de 10 cm acima do local da punção) e escolher a veia a puncionar;
- ° Desinfetar o local com álcool a 70% e esperar cerca de 30 segundos. De seguida desinfetar com iodopovidona a 1% em movimentos circulares e deixar secar ao ar;
- ° Iniciar a extracção de sangue utilizando uma seringa e inocular o sangue colhido, não ultrapassando a proporção indicada no frasco;
- ° A inoculação para os adultos deve ser entre o 8 e os 10 ml e nas crianças entre 1 e 3 ml;
- ° Retirar o garrote e de seguida a agulha, descartando-a para um contentor de objectos cortantes;
- ° Inverter o frasco para homogeneizar a amostra;
- ° Encher, em primeiro lugar, os frascos de aerobiose e em seguida os de anaerobiose.

Tabela 5 – Número de hemoculturas a colher de acordo com a patologia em vigor no laboratório do HFZ.

Sepsis, meningite, pneumonia	Colher sequencialmente em locais diferentes 2 a 3 hemoculturas
Febre de origem desconhecida	Colher inicialmente 2 a 3 hemoculturas. Se negativas entre as 24h e 36h, efectuar mais 2 hemoculturas
Endocardite infecciosa	Efectuar 3 hemoculturas no 1º dia. Se negativas às 24h, repetir colheita de 3 hemoculturas
Doente com terapêutica antimicrobiana	A colheita deve ser feita imediatamente antes da toma do antibiótico

Fonte: Adaptado de Li, *et al.*, 2004⁶

É importante salientar que estes passos devem ser rigorosamente cumpridos para evitar contaminações, que podem levar a incorrectas interpretações dos resultados analíticos.

11.5.4 Triagem e rejeição de amostras

Após a colheita, todo o material (tubos de colheita e outros recipientes de amostras), são colocados na zona de triagem onde, através de leitura óptico dos códigos de barras, são validadas e dada a sua entrada no *software* informático.

Caso se verificasse falta de identificação da amostra, código ilegível, tubo de colheita inadequado ao parâmetro a analisar, volume de sangue insuficiente, amostras coaguladas, ou outros critérios que colocassem em causa a análise, a amostra era imediatamente rejeitada.

O preconizado no laboratório do HFZ é, sempre em caso de dúvida de qualquer natureza, optar-se pela rejeição da amostra, e proceder-se de novo à convocatória do utente, no caso de um utente externo. No caso de um doente internado, solicitava-se colheita de nova amostra ao serviço onde o doente se encontrava internado.

11.5.5 Separação de amostras

A separação das amostras é efectuada por centrifugação. Os tubos de colheita são colocados na centrífugadora refrigerada a cerca de 4°C, após repousarem cerca de 30 a 40 minutos para retracção do coágulo.

No caso dos tubos secos com e sem partículas de gel e dos tubos com heparina de lítio, a velocidade definida no laboratório é de 3500 rpm durante 10 minutos. No caso dos tubos com citrato de sódio, assim como amostras para execução do sedimento urinário, a velocidade definida é de 1600 rpm durante 10 minutos.

Após a centrifugação, é de suma importância verificar todos os tubos, uma vez que podem existir aspectos que alteram os parâmetros a analisar. Deve-se, por isso, verificar a existência de soro/plasma hemolisado, lipémico ou hiperbilirrubinémico. Assim, todos os tubos no laboratório do HFZ eram minuciosamente avaliados nesta fase.

Nestes casos, o mais correcto é proceder a uma nova colheita de sangue. Se se tratar de um caso particular como veias difíceis ou colheita em crianças, para não serem sujeitos a nova punção, procede-se com a análise solicitada e, no boletim de resultados, deve ser feita uma observação ao estado da amostra.

No caso de se verificar a existência de fibrina, que poderá danificar alguns equipamentos deve-se, com auxílio de uma pipeta Pasteur, remover a fibrina e proceder a nova centrifugação se necessário.

11.5.6 Distribuição pelos sectores e elaboração de listas de trabalho

Depois de separadas, as amostras são distribuídas pelos vários sectores do laboratório para prosseguir com a sua análise.

Existem diversos parâmetros analíticos que não são efectuados neste laboratório, devido ao número reduzido de pedidos, não justificando o investimento em novos equipamentos e reagentes. Assim, o laboratório do HFZ conta com uma parceria com outros laboratórios que são responsáveis pelo processamento de um conjunto de análises protocoladas.

Diariamente, as amostras são recolhidas no laboratório e feito o seu transporte até ao local de destino.

Os resultados analíticos são enviados para o laboratório do HFZ em formato electrónico encriptado. Nos dias úteis seguintes, os resultados são enviados em formato papel.

As listas de trabalho são emitidas diariamente através do *software* informático após a execução da maioria das colheitas. Destas listas constam os diferentes sectores do laboratório, e quais as amostras que serão processadas em cada sector com os respectivos parâmetros analíticos a efectuar.

11.5.7 Anticoagulantes

Os anticoagulantes têm a função de interromper a activação da cascata de coagulação, inibindo a formação da protrombina e impossibilitando a formação do coágulo. A heparina, o EDTA e o citrato de sódio são os principais exemplos de anticoagulantes “*in vitro*”.

Os tubos com anticoagulantes líquidos têm uma marca de referência que deve ser respeitada, uma vez que o volume de sangue vai reagir com o volume de anticoagulante, inibindo a formação de coágulo. Se o volume de sangue estiver abaixo da marca, a proporção anticoagulante/sangue não vai ser exacta, podendo falsear os resultados analíticos.

No laboratório do HFZ os tubos de colheita e os respectivos anticoagulantes existentes encontram-se resumidos na tabela apresentada abaixo.

Tabela 6 – Tubos de colheita e respectivos anticoagulantes existentes do laboratório do HFZ.

Cor dos Tubos	Anticoagulante	Sector de Análise
Castanho	Tubo seco com partículas de gel	Bioquímica Clínica, Serologia, Imunologia e Exterior
Branco	Tubo seco sem partículas de gel	Exterior
Verde	Citrato de sódio	Hemostase e Exterior
Laranja	Heparina de lítio	Bioquímica Clínica (amostras urgentes) e Exterior
Vermelho	EDTA	Hematologia

Fonte: elaborado pela autora, 2015

11.6 Fase analítica

A fase analítica corresponde ao procedimento analítico em si. Nesta fase as amostras são então processadas de acordo com o registado na fase pré-analítica.

Abordarei em seguida, de forma individual, os sectores existentes no laboratório do HFZ e nos quais tive oportunidade de exercer funções.

11.6.1 Sector de bioquímica clínica

No sector de bioquímica clínica as amostras (soro, plasma heparina de lítio, urina ocasional e de 24h e liquido sinovial) são processadas no auto-analisador *Olympus AU400*[®].

Este aparelho utiliza técnicas que têm por base princípios teóricos: ensaios fotométricos, enzimáticos, cinéticos, imuno-turbidimétricos, e possui ainda uma unidade ISE onde são determinadas espécies iónicas – ionograma.

No laboratório do HFZ, as análises inseridas neste sector e as quais passarei a descrever de seguida são, juntamente com o sector de hematologia, as análises de rotina mais requisitadas.

º **Proteínas séricas totais**

As proteínas séricas consistem no conjunto das proteínas em circulação, sendo um parâmetro analítico que permite aferir no seu conjunto, as proteínas no plasma ou no soro. As proteínas são moléculas responsáveis pela manutenção da pressão oncótica do plasma, transporte, armazenamento e imunidade².

As proteínas séricas totais são determinadas neste auto-analisador através de um ensaio de cor fotométrico.

No caso de uma hiperproteinémia, ou seja, um aumento das proteínas totais, podemos estar perante situações de desidratação, devido à ingestão de água inadequada, ou pela perda excessiva da mesma por vómitos e diarreias intensas, doença de Addison ou acidose diabética².

A hiperproteinémia pode ser ligeira e resultar de um aumento nas concentrações das proteínas presentes em concentrações baixas como as imunoglobulinas policlonais, no caso de uma infecção. Já no caso de, por exemplo, um mieloma múltiplo, estamos perante uma hiperproteinémia acentuada e que resulta de um aumento das imunoglobulinas monoclonais³.

Pelo contrário, uma hipoproteinémia pode ter como causas uma diminuição da síntese hepática de proteínas, um aumento da excreção devido a lesão renal, aumento da volémia ou distúrbios na absorção de proteínas como acontece nas doenças inflamatórias intestinais^{2,3}.

º **Proteínas urinárias**

As proteínas são filtradas no glomérulo renal tendo em conta o seu peso molecular e a sua concentração no plasma. A presença de proteínas plasmáticas na urina em quantidades superiores ao valor de referência estabelecido pela técnica em causa pode, portanto, ter um significado clínico importante².

O aumento da quantidade de proteínas presentes na urina (proteinúria) pode ocorrer devido:

- ao aumento da permeabilidade glomerular, sendo a albumina a principal proteína excretada;
- a um defeito na reabsorção tubular, resultando na excreção maioritariamente de proteínas de baixo peso molecular;
- a um aumento da concentração de proteínas no plasma, tais como hemoglobinas ou proteínas de Bence Jones;
- a secreção anormal de proteínas no tracto urinário².

O síndrome nefrótico, mieloma múltiplo, insuficiência renal, tumores renais malignos, são alguns estados clínicos patológicos nos quais há evidência de proteinúria³.

É importante salientar, que em situações intermitentes como no decorrer do exercício físico intenso ou de um estado febril, pode ocorrer um aumento de proteínas na urina².

A taxa de excreção das proteínas deve ser determinada numa colheita de urina de 24 horas, uma vez que a concentração de proteínas na urina varia durante o dia².

Os recipientes de urina de 24 horas são disponibilizados aos utentes do laboratório do HFZ. Após cada utilização, estes recipientes são sujeitos a um processo de desinfecção rigoroso para possibilitar uma posterior utilização.

o **Albumina**

A albumina é a proteína mais abundante no plasma humano, representando cerca de 60% das proteínas plasmáticas³.

Esta proteína é determinada através de um ensaio de cor fotométrico no auto-analisador existente no laboratório.

Um aumento da concentração de albumina pode ocorrer no caso de desidratação aguda ou de estase venosa excessiva. Já a diminuição pode dever-se a um aumento do catabolismo, perda de proteínas na urina, absorção reduzida de aminoácidos, entre outras situações².

Em doenças hepáticas como na cirrose hepática, doenças renais como síndrome nefrótica, doenças inflamatórias e situações de desnutrição, são exemplos em que a concentração de albumina se encontra reduzida^{2,3}.

º **Proteína C Reactiva (PCR)**

A PCR é uma proteína de fase aguda positiva produzida pelo fígado e libertada para a circulação após algumas horas do início de uma reacção inflamatória³.

Esta é determinada através do método de aglutinação.

Os níveis aumentados de PCR observam-se em situações de trauma, infecções bacterianas e virais, neoplasias ou após um enfarte agudo do miocárdio³.

Esta análise, juntamente com o hemograma, é a análise de carácter urgente mais solicitada por parte dos prescritores da consulta aberta pertencente ao centro de saúde, e que funcionava dentro das instalações do hospital.

º Glicose

A concentração da glicose no sangue varia entre limites estreitos devido à acção de várias hormonas, nomeadamente da insulina³.

A sua determinação é feita através do método da hexoquinase por ensaio UV enzimático.

A determinação da glicemia no sangue pode ser medida em jejum, após uma refeição (pós-prandial) ou como parte integrante da prova de tolerância oral à glicose (PTOG).

A PTOG é uma prova realizada a grávidas não diabéticas como rastreio, ou a pessoas que apresentem valores de glicemia em jejum aumentados de forma sistemática. Consiste na determinação da glicose em 3 alturas distintas, em jejum, aos 60 minutos e aos 120 minutos.

Geralmente, o aumento das concentrações de glicose no sangue de forma consistente traduz-se numa doença metabólica – Diabetes *mellitus* – que poderá ser tipo I, II ou gestacional.

No entanto, convém salientar que em estados clínicos como hipertiroidismo, pancreatite, síndrome de *Cushing*, pode haver aumento dos níveis de glicose no sangue³.

Por outro lado, a ingestão de álcool, insulinomas, disfunção hepática, insuficiência renal crónica, são estados patológicos que envolvem muitas vezes a diminuição dos níveis de glicose no sangue³.

o **Colesterol**

O colesterol é um crucial componente das membranas celulares e lipoproteínas, actuando também como precursor da síntese de hormonas esteróides e ácidos biliares³.

Uma parte do colesterol é derivada da alimentação contudo, a sua maioria provém da síntese endógena.

A sua determinação é feita através de ensaio de cor enzimático.

Os valores de colesterol total alterados devem ser sempre interpretados tendo em conta os valores de colesterol LDL, colesterol HDL e triglicerídeos.

O colesterol HDL (colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidade) é responsável pela remoção do colesterol dos tecidos para o fígado para ser metabolizado ou excretado. É considerado, por isso, como o colesterol “protector” e valores baixos de HDL constituem um factor de risco para doenças cardiovasculares².

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) transportam grande parte do colesterol do fígado até aos tecidos, onde irá ser utilizado. Estas lipoproteínas são responsáveis pelos depósitos do colesterol na parede das artérias, dando origem às placas de aterosclerose.

O colesterol LDL vulgarmente conhecido como o “mau colesterol”, pode ser calculado através da fórmula de Friedwald:

$$\text{LDL (mg/dL)} = \text{Colesterol total} - (\text{Triglicerídeos} / 5 + \text{HDL})^2.$$

Apesar de se poder recorrer à supracitada fórmula, a maioria das vezes a sua determinação é executada através do *kit* de reagente próprio do auto-analisador.

Tanto no caso do colesterol HDL, como no caso do colesterol LDL, o método de determinação é através de ensaio de cor enzimático.

º **Triglicerídeos**

Os triglicerídeos são os ésteres de colesterol mais comuns na alimentação humana. No entanto, podem ser produzidos pelo próprio organismo³.

A sua determinação é feita através de um ensaio de cor enzimático.

A interpretação dos seus valores deverá ser feita juntamente com os valores de colesterol, como já referi anteriormente.

º **Ureia**

A ureia é o principal produto final do metabolismo proteico, sendo sintetizada no fígado e excretada em grande quantidade na urina³.

A sua determinação no auto-analisador *Olympus AU400*® é feita através de um ensaio UV cinético.

Níveis aumentados de ureia na urina podem indicar o aumento do catabolismo proteico, dietas hiperproteicas e situações de hipertireoidismo. Já níveis reduzidos observam-se na insuficiência renal e hepática, dietas pobres em proteínas e obstruções do tracto urinário³.

º Creatinina

A creatinina resulta do metabolismo da creatina e da fosfocreatina no músculo, sendo libertada para o plasma e excretada pelos rins³.

A sua determinação é executada através de um ensaio de cor cinético.

A creatinina revela-se um excelente parâmetro de avaliação da função renal, já que a sua produção apenas depende do metabolismo celular muscular e é quase, exclusivamente eliminada por filtração glomerular, não sendo influenciada directamente pela ingestão de alimentos.

Os níveis sanguíneos de creatinina são indicativos da capacidade de filtração glomerular. Assim, um aumento dos níveis desta no soro são indicativos de problemas na função renal como pielonefrites, obstruções do tracto urinário, necrose tubular aguda, entre outras².

Os níveis séricos de creatinina são avaliados em conjunto com os níveis urinários, recorrendo-se à urina de 24 horas para o cálculo da depuração da creatinina. Este parâmetro permite avaliar a velocidade e a eficiência da filtração renal.

A depuração da creatinina é calculada através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Depuração (mL/min)} = \frac{\text{creatinúria (mg/dL)} \times \text{volume (mL)}}{\text{creatinémia (mg/dL)} \times 1400 \text{ (s)}^2}$$

Pela interpretação desta fórmula se compreende que a depuração da creatinina varia inversamente com a concentração da creatinina no soro, ou seja, quando a creatinina no soro é elevada, a depuração é diminuída indicando dano renal.

Importa salientar que um aumento da depuração da creatinina pode ser observado ocasionalmente durante a gravidez, após exercício físico ou após a ingestão de grandes quantidades de carne².

o **Ácido úrico**

O ácido úrico é um composto nitrogenado resultante do metabolismo das purinas e é excretado sobretudo na urina².

É determinado através de um ensaio de cor enzimático.

O ácido úrico não é considerado um bom parâmetro de avaliação da função renal devido à presença de alterações metabólicas ou alimentares que aumentam a sua concentração plasmática, sem que haja disfunção renal³.

Níveis elevados de ácido úrico na urina são frequentemente observados em situações como a gota, mieloma múltiplo e outras doenças malignas, assim como em dietas ricas em purinas.

o **Microalbuminúria**

Este parâmetro traduz a presença de albumina em amostras de urina, em quantidades superiores ao normal, ou seja, excreção urinária de albumina superior a 30 mg/dL².

A albumina encontra-se presente em grandes quantidades no sangue, mas quase nenhuma é eliminada na urina quando existe uma normal função renal. Contudo, na presença de lesão ou doença renal, a albumina passa a ser eliminada na urina.

A sua determinação é feita através de um ensaio imuno-turbidimétrico.

A microalbuminúria é um parâmetro importante, nomeadamente, no controlo de doentes diabéticos, indicando o grau de comprometimento renal – nefropatia diabética.

Esta análise era comumente solicitada por parte dos serviços de internamento, nomeadamente o serviço de medicina interna.

o **AST/GOT e ALT/GTP**

As transaminases aspartato aminotransferase (AST ou GOT) e alanina aminotransferase (ALT ou GTP) são parâmetros analíticos comumente solicitados no laboratório do HFZ. Ambas são determinadas pelo princípio de ensaio UV cinético no auto-analisador *Olympus AU400*.

A AST está presente em altas concentrações no citoplasma e nas mitocôndrias de alguns órgãos (fígado, pâncreas, rins, músculos esquelético e cardíaco, entre outros), sendo libertada no sangue aquando de uma lesão³.

Os níveis aumentados de AST podem ser detectados em hepatites agudas, doenças hepáticas associadas a necrose, cirrose hepática, colestase extra-hepática, carcinoma hepático excepto nos estádios iniciais da doença, entre outras situações patológicas³.

Na pancreatite aguda, doença hemolítica, após a ingestão de álcool ou de opiáceos, os níveis de AST apresentam elevações ligeiras³.

Importa referir, que a sua determinação em soros hemolisado pode dar origem a valores falseados, já que a AST está presente nos eritrócitos.

A ALT é a transaminase mais específica do fígado e, raramente, a elevação dos seus valores não está relacionada com doenças hepáticas. Assim, níveis acentuadamente elevados de ALT podem ser detectados em hepatites víricas, tóxicas, cirrose, carcinoma hepatocelular, mononucleose, lesões hepáticas após insuficiência cardíaca^{2,3}.

Níveis moderados desta transaminase podem também ser detectados após ingestão de álcool ou drogas, tal como a AST^{2,3}.

° γ -GT

A gama-glutamil transferase é um indicador enzimático muito sensível de doenças hepatobiliares, e a sua actividade é elevada em todas as formas de doença hepática².

Em situações de colestase intra e extra-hepática (em níveis muito acentuados), no carcinoma hepático primário ou metastático, pancreatite aguda e crónica e cirrose, verificam-se níveis aumentados de γ -GT³.

Importa, no entanto, referir que elevações desta enzima podem estar associadas à ingestão de grandes quantidades de álcool e algumas drogas.

No laboratório do HFZ, eram monitorizados doentes provindos de uma clínica de reabilitação de drogas e álcool, sendo o hemograma e a determinação das transaminases (AST, ALT) e da γ -GT, os parâmetros analíticos mais solicitados.

° ALP

O doseamento da fosfatase alcalina é particularmente importante no estudo das doenças hepatobiliares e doenças ósseas².

Nas doenças hepatobiliares os níveis de fosfatase alcalina encontram-se aumentados em situações de obstrução extra e intra-hepática do fluxo biliar e hepatites infecciosas.

Nas doenças ósseas os níveis de ALP encontram-se elevados em doenças como por exemplo, raquitismo, osteomalacia e doença de Paget².

É frequente, mulheres no terceiro trimestre de gravidez, apresentarem níveis aumentados de ALP, nomeadamente da fosfatase alcalina placentária.

º **Bilirrubinas**

A maioria da bilirrubina produzida é derivada da fracção heme da hemoglobina libertada pela destruição dos eritrócitos senescentes².

No laboratório do HFZ era frequente o pedido de determinação da bilirrubina total e directa (ou também apelidada de conjugada).

O aumento da concentração da bilirrubina total deve-se quer a um aumento da bilirrubina não conjugada, aumento da bilirrubina conjugada, ou de ambas.

A bilirrubina é insolúvel no plasma, sendo transportada no plasma ligada à albumina até ao fígado, local onde é conjugada com o ácido glucorónico, tornando-a hidrossolúvel – bilirrubina directa ou conjugada – sendo posteriormente eliminada pela bÍlis².

A hiperbilirrubinemia conjugada deve-se, entre outras situações, a obstruções do fluxo da bÍlis (colestase), hepatite alcoólica, hepatite vírica aguda, cirrose biliar, carcinoma hepático ou pancreático³.

No caso da hiperbilirrubinemia conjugada, podem ser situações que incluem anemia hemolítica, reacções transfusionais, infecções, entre outras.

Também se deve ter em conta que amostras hemolisadas, poderão conduzir a resultados falseados.

Ambas as bilirrubinas no auto-analisador existente no laboratório são determinadas através de um ensaio de cor fotométrico.

º **Amilase**

As amilases estão presentes em maior concentração no pâncreas e nas glândulas salivares.

Assim, os níveis séricos e urinários da amilase estão aumentados em situações como pancreatites, apendicite, lesões das glândulas salivares e muitas vezes na intoxicação alcoólica grave^{2,3}.

A determinação da amilase no soro encontra-se frequentemente associado à medição da lipase no diagnóstico e acompanhamento de pancreatites e outras doenças do pâncreas. No entanto, no laboratório do HFZ só se procedia à determinação da amilase, sendo a determinação da lipase solicitada ao exterior.

º **Férrico sérico, Ferritina e Transferrina**

A determinação destas três análises em conjunto era comumente solicitado no laboratório do HFZ.

O aumento da concentração do ferro sérico pode dever a um aumento da ingestão de ferro, a múltiplas transfusões sanguíneas, doenças hepáticas ou em casos de hemocromatose. Por outro lado, concentrações reduzidas de ferro são observadas em anemias por falta deste elemento essencial, em casos de inflamações ou infecções, doenças malignas, gravidez e menstruação abundante^{2,3}.

O doseamento da ferritina é um indicador sensível dos níveis de ferro presentes no organismo, sendo que as variações na concentração de ferro são reflectidas nos valores de ferritina.

A transferrina é uma glicoproteína de fase aguda negativa, logo as suas concentrações vêm diminuídas em estados inflamatórios. Já valores aumentados de transferrina observam-se em casos de carência de ferro como em anemias por falta de ferro, hemorragias, gravidez e na administração de estrogénios².

° **Ionograma**

Os electrólitos afectam a maioria dos processos metabólicos das células³.

No módulo ISE do auto-analisador são determinados os iões Na^+ , K^+ e Cl^- .

A calibração deste parâmetro era executada diariamente no laboratório, sendo um dos parâmetros em que mais existiam problemas aquando da calibração. Muitas vezes era necessário utilizar novos calibradores e executar mais do que uma calibração diária.

No próprio aparelho auto-analisador, estão introduzidos os valores de referência em vigor do laboratório do HFZ. Assim, qualquer amostra que estivesse fora da média definida (um desvio padrão), era automaticamente repetida a sua determinação.

Quando tal acontecia e, a confirmar-se o valor, uma nota era inserida no boletim analítico.

11.6.1.1 **Urianálise**

A urianálise é parte integrante da bioquímica clínica. Nesta secção, realiza-se o exame sumário de urina, englobando a urina tipo II e o sedimento urinário.

Nas urinas do tipo II são determinados os seguintes parâmetros: glicose, proteínas totais, bilirrubinas, urobilinogénio, pH, hemoglobina, corpos cetónicos, nitratos, leucócitos e densidade, tendo em conta a tira utilizada na determinação.

O equipamento utilizado para efectuar a leitura das tiras de urina tipo II é o *Clinitek 500®*. Este equipamento é um espectrofotómetro, que utiliza como método a reflectância, analisando a cor e a intensidade da luz reflectida na área da tira onde ocorre a reacção, convertendo os resultados em unidades com significado clínico.

No laboratório do HFZ, após a determinação da urina tipo II, é sempre efectuado o sedimento urinário, para comprovar ou não a existência de possíveis estados patológicos.

No sedimento urinário, através da observação microscópica do mesmo, é observado a existência ou não de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cilindros, bactérias, leveduras, cristais, granulações e parasitas.

O sedimento urinário é executado manualmente, procedendo da seguinte forma:

- colocar 10 ml de urina num tubo de fundo cónico;
- centrifugar a amostra 5 minutos a 2500 rpm;
- desprezar o sobrenadante;
- colocar uma gota do concentrado, entre lâmina e lamela;
- observar ao microscópio na objectiva de 10x (para células epiteliais e cilindros) e 40x (para os restantes parâmetros).

Durante o meu estágio pude observar diariamente sedimentos urinários.

11.6.1.2 Técnicas Manuais

° Pesquisa de sangue oculto nas fezes

O *kit* utilizado na determinação de sangue oculto nas fezes no laboratório, é o *Hem Check*®. Este é um teste imunocromatográfico para a detecção de sangue oculto nas fezes. Trata-se de um teste simples, que pode ser efectuado rapidamente.

A pesquisa de sangue oculto nas fezes é habitualmente processado em 3 amostras de fezes diferentes. No entanto, era comum haver pedidos do exterior para pesquisar em 6 amostras diferentes.

° Teste Imunológico da Gravidez

O teste de gravidez neste laboratório é efectuado através do kit comercial *OREA hCG*® a partir de uma amostra de urina. Este teste permite uma detecção qualitativa e rápida (cerca de 10 minutos) da gonadotrofina coriónica humana na urina.

O resultado deste teste era sempre emitido de forma “positiva” ou “negativa”, desaconselhando sempre a sua utilização para diagnósticos definitivos.

Por vezes, era aconselhada a determinação sanguínea da gonadotrofina coriónica humana, análise essa que era efectuada no exterior num parceiro do laboratório do HFZ.

11.6.2 Sector de Hematologia

O sector de hematologia no laboratório do HFZ está equipado com o equipamento *SysmexXT 2000*[®], que utiliza nas determinações analíticas como métodos, a citometria de fluxo, focagem hidrodinâmica e o método da SLS-hemoglobina.

A análise executada neste auto-analisador é o hemograma.

O hemograma compreende a contagem dos elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos, plaquetas e, em determinadas situações, reticulócitos) e o cálculo dos índices eritrocitários como o volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração da hemoglobina globular média (CHGM), a partir do doseamento da hemoglobina e do hematócrito².

O hemograma é uma das análises mais solicitadas, por rotina, no laboratório do HFZ.

As amostras que se encontram com resultados analíticos fora dos valores de referência estabelecidos, são submetidas a nova determinação dos parâmetros, e é efectuado o esfregaço de sangue periférico de forma manual.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de executar inúmeros esfregaços sanguíneos, assim como proceder à validação de hemogramas.

Para a obtenção de um esfregaço sanguíneo de boa qualidade é necessário assegurar que se obtém 3 zonas complementares - cabeça, corpo e cauda –, e que tem cerca de 3 a 4 cm de comprimento.

A quantidade sangue utilizada deve ser adequada, de modo a obter uma extensão fina e deve ser regular e homogéneo. Antes de se efectuar o esfregaço, deve-se certificar que as lâminas utilizadas se encontram limpas e desengorduradas.

Os esfregaços sanguíneos devem ser devidamente corados, para poder ser efectuada uma boa visualização microscópica.

A coloração utilizada no laboratório é o *Giemsa* modificado. Nesta coloração é primeiramente utilizada uma solução de etanol, que actua como fixante. Posteriormente, são utilizados dois corantes que vão permitir a coloração das diferentes estruturas celulares.

Pode dividir-se um hemograma em três partes distintas: eritrograma, leucograma e plaquetograma. Nestas partes distintas podem encontrar-se vários interesses clínicos:

o Eritrograma: os eritrócitos são células do tecido sanguíneo que podem apresentar variações. Estas podem ser classificadas quanto ao tamanho (anisocitose), à forma (poiquilocitose), conteúdo de hemoglobina (anisocromia) e à estrutura.

O seu estudo permite a detecção de anemias microcíticas/macrocíticas e anemias hipocrómicas/normocromicas/ hipercromicas. Esta classificação é possível graças aos índices eritrocitários².

o Leucograma: pode-se observar a presença de leucopenias (reduzido número de leucócitos) e leucocitoses (elevado número de leucócitos), bem como a distribuição leucocitária.

Uma leucopenia reflecte a incapacidade da resposta medular a agentes estimulantes. Esta pode ocorrer em casos de infecção bacteriana, vírica ou intoxicação³.

Uma leucocitose reflecte a resposta medular a agentes estimuladores. Esta pode ocorrer em situações de leucemia ou intoxicação³.

O valor da distribuição leucocitária pode dar informações valiosas quanto ao tipo de infecção. Uma eosinofilia pode estar associada a uma infecção parasitária/doença alérgica; uma linfocitose a uma infecção viral; e uma neutrofilia a uma infecção bacteriana².

o Plaquetograma: existe grande interesse no estudo das plaquetas, sempre que há uma perturbação da hemostasia ou suspeita de doença hematológica³.

Na análise das plaquetas podem ser detectadas patologias como a trombocitose (número elevado de plaquetas) e trombocitopenia (défice de plaquetas)².

Numa trombocitose há o risco da ocorrência de uma trombose, que pode ser causada por carência de ferro, inflamações ou em doentes esplenectomizados, ou seja, a quem foi retirado o baço. Uma trombocitopenia pode ser, por exemplo, provocada pelo alcoolismo, infecções virais³.

Para efectuar a validação de um hemograma é necessário consultar os valores de referência que devem estar de acordo com o doente a tratar, ver o diagnóstico e histórico do mesmo.

Em casos de trombocitopenias é necessário ter o cuidado de verificar se a amostra se encontra coagulada. Se esta estiver, deve ser pedida nova amostra. Se não estiver coagulada, deve ser efectuado um esfregaço sanguíneo para verificar a presença de possíveis agregados plaquetários. Este era um princípio estabelecido no laboratório.

A contagem de reticulócitos no sangue periférico reflecte de um modo bastante exacto, a actividade eritropoiética da medula, o que é útil na monitorização da terapêutica. A taxa normal do valor de reticulócitos no sangue periférico de um adulto é de 0,5 a 2,0% do número total de eritrócitos².

A contagem de reticulócitos era efectuada no auto-analisador.

11.6.2.1 Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação no laboratório do HFZ é determinada de forma manual. O tubo é colocado durante uma hora na vertical e medido o seu valor na escala medidora para o efeito.

O resultado desta prova não é específico para nenhuma patologia em particular, mas indica a presença ou ausência de um processo inflamatório.

Dentro de certos limites, serve para avaliar quanto à gravidade do quadro patológico. Esta prova pode encontrar-se elevada em situações de doenças infecciosas agudas, carcinomas, intoxicação aguda por metais pesados, desordens hepáticas, doenças reumáticas, entre outras².

Importa referir que se foi verificando uma diminuição dos pedidos relativos a este parâmetro analítico.

11.6.3 Sector da Coagulação/Hemostase

O aparelho utilizado neste sector para efectuar o estudo da coagulação/hemostase, é o *ACL 9000®*. Este equipamento utiliza diferentes métodos de leitura consoante a determinação a realizar.

Embora este equipamento permita efectuar várias determinações, as realizadas no laboratório do HFZ são, o tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial activado (APTT) e o fibrinogénio.

o Tempo de protrombina e INR

O TP é o teste da coagulação mais realizado. O valor do TP é obtido através da adição de uma concentração específica de tromboplastina e cálcio ionizado, e consequente determinação do tempo de coagulação, após incubação. Quando é adicionada a tromboplastina e o cálcio ao plasma tratado com citrato, esses compostos substituem o factor tecidual na activação do factor X em presença do factor VII, sem envolver plaquetas e outros factores da via intrínseca².

Esta determinação avalia a via extrínseca nomeadamente os factores I, II, V, VII e a via comum, que possui o factor X^{2,3}.

Os valores de TP dependem do tipo de reagente utilizado e, portanto, estão sujeitos a variações significativas entre os laboratórios. Os tempos de protrombina foram assim padronizados em INR (*International Normalized Ratio*). O INR possui a seguinte fórmula:

$$\text{INR} = (\text{TP do paciente} / \text{TP de referência})^2.$$

Assim, cada reagente possui um valor relativo (*International Sensitivity Index*, ISI) com relação ao reagente padrão (possui um ISI de 1,0). Consequentemente, os valores corrigidos de TP para esta razão fornecem um valor de INR “normalizado” entre laboratórios, independentemente da variabilidade dos reagentes utilizados.

O INR é aplicado principalmente na monitorização de anticoagulantes orais como por exemplo, a varfarina e o acenocumarol. Quando este valor se encontra aumentado, significa que o doente corre riscos pró-trombóticos. Pelo contrário, se este valor estiver diminuído ocorrem riscos de hemorragias espontâneas².

Os doentes hipocoagulados estão sujeitos a uma terapêutica de anticoagulantes orais de forma a evitar a formação de coágulos no sangue, no entanto, estão mais susceptíveis à ocorrência de hemorragias, principalmente quando sofrem traumatismos.

A determinação do valor de INR nestes indivíduos é importante para regular a dose de medicamento anticoagulante que deverá ser tomada.

Os doentes hipocoagulados seguidos no hospital faziam a sua determinação de INR no laboratório do HFZ às terças-feiras entre as 08h30 e as 11h30.

Relativamente aos valores de TP, estes podem estar aumentados em situações como, a terapêutica com anticoagulantes orais, deficiência de factor isolado II, V, VII e X, doenças hepáticas graves, deficiência de vitamina K, coagulação intravascular disseminada (CID) e transfusões sanguíneas maciças³.

º **Tempo de Tromboplastina Parcial Activado**

O APTT avalia a via intrínseca da cascata de coagulação, nomeadamente os factores VIII, IX, XI e XII, e a via comum, possuindo o factor X. Esta determinação é frequentemente utilizada para a monitorização laboratorial de heparina².

O valor de APTT normal pode variar de 28 a 40 segundos. Valores prolongados deste parâmetro pode ocorrerem em situações como, a deficiência de factores específicos da via intrínseca, doenças hepáticas, CID, transfusões de sangue maciças e terapêutica com heparina².

Pode estar diminuído em qualquer estado de hipercoaguabilidade².

º **Fibrinogénio**

O fibrinogénio é exclusivo do plasma e a velocidade de formação do coágulo é afectada pelos seus níveis. Depois da formação do coágulo, o plasma não deve conter nenhum fibrinogénio residual.

A sua determinação é utilizada no diagnóstico de patologias, tais como, CID, doenças hepáticas e quadros inflamatórios.

As concentrações elevadas de fibrinogénio associam-se a um aumento de risco trombótico, já níveis baixos surgem em várias situações nomeadamente em situações de terapêutica trombolítica, doenças hepáticas e CID³.

11.6.4 Sector de Imunologia e Serologia

A maioria das análises de imunologia são efectuadas no exterior, pois o laboratório não tinha diariamente uma quantidade de pedidos que justificasse a existências de meios para a sua determinação no laboratório.

Este sector dispunha de dois auto-analisadores, o sistema *Vidas*® e o *Unicap 100*®.

No sistema *Vidas*®, procede-se à determinação das seguintes análises:

- Antigénio HBs: utilizado no diagnóstico de infecções pelo vírus da hepatite B e na monitorização do estado do individuo infectado. Este é detectável no soro durante o período de incubação, mesmo antes do aparecimento dos sintomas típicos.
- Anticorpo HBs: utilizado para a monitorização dos resultados da vacinação contra o vírus da hepatite B.
- Anticorpo HBc (total): utilizado para monitorizar o progresso da infecção pelo HBV. Os anticorpos HBc são detectados no soro pouco tempo após o aparecimento do antigénio da superfície do HBV.
- Antigénio HBe: esta determinação é efectuada para monitorizar os progressos da infecção por HBV. Este antigénio encontra-se na fase mais virulenta da infecção.
- Anticorpos totais do Vírus da Imunodeficiência Humana 1 e 2 (VIH): a determinação destes anticorpos funcionava como um “*screening*” inicial. No caso de amostras reactivas, era enviado o soro em causa para o Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP para a confirmação de resultados. Na maioria das vezes, eram solicitadas novas amostras.

No auto-analisador *Unicap 100®* determinam-se análises no campo da imunoalergologia:

- IgE total;
- IgE específica: teste que mede os anticorpos IgE específicos em alérgenos presentes no soro, permitindo a identificação do agente desencadeador da alergia.

No laboratório do HFZ determinam-se as seguintes específicas:

- ✓ Phadiatop inalante: teste de rastreio para a pesquisa de alérgenos inalantes, tais como os ácaros, árvores, gramíneas, caspa de gato e/ou cão.
- ✓ Multi-RAST FX5E: teste de identificação atópica que contém alérgenos alimentares, tais como o leite, ovos, trigo, amendoim, soja e bacalhau.
- ✓ Phadiatop Infant: teste de identificação atópica, utilizado para crianças com menos de 4 anos. Contém alérgenos inalantes e alimentares, responsáveis por 98% das alergias em crianças.

Para estudos mais aprofundados, as amostras eram enviadas para o exterior.

11.6.4.1 Serologia Manual

° Reacção de Widal, Wright e Weil Félix

Na reacção de *Widal, Wright e Weil Félix* são utilizadas suspensões bacterianas para a detecção, identificação e quantificação de aglutininas séricas que se formam durante certas doenças infecciosas.

As determinações efectuam-se colocando a amostra em contacto com as suspensões bacterianas e observando a presença ou ausência de aglutinação visível que indicará a presença ou ausência do anticorpo correspondente.

Estes testes são efectuados pelo *kit* comercial *Newmarket Laboratories Ltd®*.

° Reacção de Widal

Esta reacção permite pesquisar os anticorpos anti-*Salmonella* presentes no soro ou plasma do doente. A reacção dá-se entre a suspensão contendo antigénios de *Salmonella* (antigénios O e H) e o anticorpo presente no soro, e é positiva quando surge aglutinação.

Este teste serve para diagnóstico da febre tifóide.

° Reacção de Wright

Esta reacção permite pesquisar anticorpos no soro ou plasma do doente, que se desenvolvem durante infecções causadas pela bactéria da espécie *Brucella abortus*.

Este teste serve para diagnóstico da Brucelose.

º **Reacção de Weil Félix**

Esta reacção permite pesquisar os anticorpos anti-*Rickettsia*, por aglutinação, utilizando para isso suspensões de antígenos de *Proteus*, juntamente com o soro ou plasma do doente.

Este teste permite obter o diagnóstico da febre da carrapa, que tem como agente etiológico a *Rickettsia*.

º **Reacção de Paul-Bunnell**

Trata-se de um teste de hemoaglutinação qualitativo, para o diagnóstico presuntivo da mononucleose infecciosa, que é causada pelo vírus *Epstein Barr*.

Neste teste, o soro ou plasma do doente é colocado em contacto com um reagente composto por eritrócitos de ovelha, cavalo, boi e coelho.

Se o indivíduo estiver infectado com mononucleose infecciosa, este irá ser portador de anticorpos no seu soro, que irão reagir com os antígenos específicos presentes nos eritrócitos, formando uma aglutinação.

No entanto, esta reacção não apresenta grande especificidade, pois existe a possibilidade de indivíduos saudáveis apresentarem reacções positivas, devido ao facto de possuírem anticorpos designados de *Forssman* capazes de aglutinar os eritrócitos presentes no *kit*.

Este teste foi efectuado pelo *kit* comercial *M.N.I Test Fumonze®*.

º **Reacção de VDRL**

O teste de aglutinação não treponénico serve para a detecção qualitativa de anticorpos (denominados reaginas) presentes no soro ou plasma de doentes com sífilis. Esta reacção permite obter um diagnóstico presuntivo de indivíduos infectados pelo *Treponema pallidum*.

Neste teste utilizado no laboratório do HFZ, o reagente é preparado a partir de uma suspensão coloidal de cardiolípidos, lecitina e colesterol, corado de azul.

Na ocorrência de um resultado positivo existe uma aglutinação visível a olho nu, entre os anticorpos anti-cardiolipídicos (reaginas) e os cardiolípidos presentes no reagente.

É natural que possam ocorrer reacções falsamente positivas quando os doentes são portadores de outras infecções, além da sífilis. Se o teste apresentar um resultado positivo, deve realizar-se outro teste mais específico para a confirmação deste (por exemplo o TPHA).

Este teste foi efectuado pelo *kit* comercial *SYPAL CB*®.

º **Reacção de TPHA**

O teste de hemoaglutinação treponénico serve para a detecção semi-quantitativa de anticorpos específicos do *Treponema pallidum*, presentes no soro ou plasma de doentes com sífilis. Esta reacção permite obter um diagnóstico definitivo, de indivíduos infectados pelo *Treponema pallidum*.

As reacções positivas são detectadas pela ocorrência de aglutinação das células. Nas reacções negativas ocorre um assentamento das células num pequeno botão ou num pequeno anel.

Este teste foi efectuado pelo *kit* comercial *Newmarket Laboratories*®.

11.6.5 Sector da Microbiologia

O sector da microbiologia no laboratório de análises clínicas do HFZ é um sector onde se executam um número reduzido de análises, sendo a maioria das análises desta área processadas no exterior.

As amostras que chegam a este sector são essencialmente urinas, fezes, hemoculturas e tubos de soro. As amostras como líquidos biológicos, pus e expectoração, são enviadas para o exterior.

O exame mais frequente que se executa neste sector é o exame bacteriológico da urina.

Para auxiliar as análises bacteriológicas, existem testes complementares, como o antibiograma e API 20 E®.

Os meios de cultura existentes no laboratório são os seguintes:

- **Meio de CPS** – um meio sólido, diferencial e cromogénio.

- **Gelose de sangue** – um meio sólido, enriquecido, que permite o crescimento de bactérias fastidiosas.
No laboratório este meio é utilizado para a repicagem das hemoculturas e para o isolamento das bactérias que cresceram no meio CPS.

- **Hemoline™ Performance Difásico** – frasco composto por dois meios de cultura. Um caldo enriquecido em factores de crescimento e uma gelose que cobre uma das faces do frasco. Este frasco destina-se à pesquisa de microrganismos aeróbios.

- ***Hemoline*TM Performance Anaeróbio** – o meio de cultura contém factores de crescimento para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios.

- **Meio de Transporte** – o laboratório está equipado com zaragatoas estéreis que se inserem num meio de transporte (AMIES), permitindo transportar líquidos biológicos, como pus, exsudados e fezes, para serem analisados nos laboratórios do exterior.

º **Exames Bacteriológicos**

Os exames bacteriológicos consistem em semear a urina num meio de cultura. Este processo é efectuado sempre ao bico de *Bunsen*, criando uma atmosfera estéril para protecção de contaminações.

A sementeira executa-se para um placa com o meio de cultura CPS, através da técnica de esgotamento do inóculo. Este procedimento é efectuado com uma ansa descartável, com um volume de 1µL. O volume da ansa é importante, uma vez que a repicagem vai influenciar o número de colónias no final.

Os agentes etiológicos mais frequentemente isolados em infecções urinárias no laboratório do HFZ são a *E. coli*, *P. mirabilis* e *Klebsiella sp.*

Depois de semear a placa é colocada na estufa, fornecendo as condições ideais (37°C, 24 horas) para que as bactérias cresçam. Passadas 24 horas observa-se a placa.

Caso não haja crescimento no meio de CPS o resultado final é dado como negativo. Se houver crescimento é necessário estimar o número das colónias. Para isso existe uma escala de contagem de colónias.

No caso de crescimento de estirpes não passíveis de serem isoladas no laboratório do HFZ, é efectuada uma repicagem para gelose de sangue e é enviada para o exterior, juntamente com a placa original.

O exame bacteriológico é sempre realizado antes de qualquer outro exame, uma vez que ao abrir o recipiente da urina vamos sujeita-lo a contaminações do exterior, podendo influenciar no crescimento das bactérias.

O API 20 E® é um sistema padronizado para a identificação das *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos, utilizado no laboratório do HFZ.

Este teste contém galerias com substâncias desidratadas que em contacto com uma suspensão bacteriana vão reagir.

Depois de inocular a suspensão, o teste fica a incubar durante 24 horas a 37°C. A leitura é efectuada através de um quadro presente na bula do *kit*, obtendo-se um código. Com o código identifica-se a bactéria com o auxílio de um catálogo analítico.

O antibiograma é utilizado para determinar a sensibilidade da bactéria aos antibióticos. A galeria existente contém 16 pares de cúpulas, o primeiro par funciona como controlo e os restantes têm antibióticos com uma ou duas concentrações.

A bactéria a estudar é colocada numa suspensão que depois vai ser distribuída pelas cúpulas. Após a incubação (24 horas a 37°C), a leitura é efectuada visualmente. As estirpes são classificadas como sensíveis, intermédias ou resistentes, sendo as sensíveis as estirpes que não cresceram e resistentes as que cresceram.

◦ Hemoculturas

No laboratório do HFZ só se procede à análise das hemoculturas aeróbias, uma vez que as anaeróbias vão para o exterior.

As hemoculturas são colocadas a incubar na estufa a uma temperatura de 37°C durante 24 horas. Passadas as 24 horas é efectuada uma repicagem para uma placa de gelose de sangue e coloca-se na estufa.

Caso se verifique, ao fim de 24 horas, crescimento a hemocultura é enviada para o exterior. Se não houver crescimento a hemocultura fica a incubar durante 8 dias.

Diariamente é efectuada a observação macroscópica da hemocultura, com o intuito de ver aferir se existem alterações.

Ao fim de 8 dias é efectuada nova repicagem para gelose de sangue, e é colocada na estufa. Passadas 24 horas se não houver crescimento bacteriano, conclui-se que a hemocultura é negativa.

Caso se verifique crescimento procede-se, como referi anteriormente, ao seu envio para o exterior.

Uma pequena amostra da hemocultura é visualizada ao microscópio, após a coloração de Gram para aferir se estamos na presença de bactérias de Gram positivas (coram de roxo) ou bactérias de Gram negativo (coram de vermelho).

11.6.6 Controlo de Qualidade

No laboratório do HFZ diariamente são efectuados os controlos de qualidade internos.

Estes consistem na análise de uma amostra controlo com valores conhecidos dos analitos, de modo a avaliar a precisão dos resultados.

A execução do controlo de qualidade é efectuada logo após a manutenção diária dos aparelhos e antes de iniciar qualquer determinação de qualquer parâmetro analítico.

Os controlos de qualidade internos existentes no laboratório são, todos eles das casas comerciais às quais pertenciam os auto-analisadores.

Os resultados do controlo são gravados no aparelho, sendo construídas cartas de controlo de modo a analisar se os resultados se encontram dentro dos limites aceitáveis de erro (média mais ou menos dois desvios padrão).

O laboratório do HFZ está inscrito no programa de avaliação externa de qualidade do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, que consiste na análise de uma amostra desconhecida que é enviada pelo programa.

Posteriormente, os resultados são comparados com os resultados obtidos pelos outros participantes no programa.

No entanto, no decorrer do meu estágio, este programa foi interrompido devido a restrições orçamentais.

11.7 Fase Pós-Analítica

A fase pós-analítica é a terceira e última fase do ciclo analítico. Esta fase corresponde à interpretação e validação dos resultados.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de validar inúmeras análises efectuadas e aplicar, assim, os conhecimentos teóricos apreendidos.

Aquando da validação de qualquer resultado é sempre necessário ter em conta o histórico do doente, sempre que ele exista.

Por vezes, um valor analítico fora dos valores de referência poderá em determinado doente, não apresentar valor clínico relevante.

É crucial entender-se a importância da solicitação de nova amostra ou repetição de determinado ensaio.

Os resultados das análises clínicas no laboratório para os doentes internados são disponibilizados via *on-line*. Somente para doentes externos, são impressos em formato papel os resultados analíticos.

11.8 Conclusão

A realização deste estágio no âmbito do mestrado em análises clínicas foi importante, na medida em que me permitiu aplicar os conhecimentos teóricos apreendidos pelas diversas unidades curriculares. Permitiu, também, entender o funcionamento básico de um laboratório de análises clínicas inserido em ambiente hospitalar.

Apesar de o laboratório do HFZ ser um laboratório de pequena dimensão, tal permitiu a consolidação de conhecimentos que serviram de base ao posterior aprofundar de diversas áreas das análises clínicas.

Com este estágio, pude acompanhar e perceber a rotina de um analista clínico e apreender a importância de um controlo rigoroso de cada fase do ciclo analítico.

Sem dúvida esta experiência revelou-se muito enriquecedora tanto a nível profissional, como pessoal.

11.9 Referências bibliográficas

1. Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. H. (2011). *Essential haematology* (6th edition). Oxford, England: John Wiley & Sons.
2. Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E. (2008). *Tietz: Fundamentals of clinical chemistry* (6th edition). Philadelphia, U.S.A: Elsevier.
3. Fauci, A. S., Braunwald, E., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., Loscalzo, J. & Harrison, T. R. (2008). *Harrison's principles of internal medicine* (17th edition). New York, U.S.A: McGraw Hill Education.
4. Ferreira, W. C., Sousa, J. C., & Lima, N. (2010). *Microbiologia* (1^a edição). Lisboa, Portugal: Lidel, edições técnicas.
5. Goldsby, R. A., Kindt, T. J. & Osborne, B. A. (2001). *Kuby: Immunology* (4th edition). New York, U.S.A: Freeman and Company.
6. Li, J., Plorde, J.J., & Carlson, L.G. (2004). Effects of volume and periodicity on blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2829-2831.